

UNTERSUCHUNGEN ZUR VEREINFACHUNG DES ENZYMIMMUNOLOGISCHEN

NACHWEISES VON AFLATOXIN M₁ IN MILCH

Andreas Heusel

Disbui. München

1987



Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Untersuchungen zur Vereinfachung des enzymimmunologischen
Nachweises von Aflatoxin M₁ in Milch

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Andreas Heusel
aus
Ingelheim am Rhein

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Rambeck

Tag der Promotion: 24. Juli 1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554631_0009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	3
2.1 Aflatoxin M ₁	3
2.1.1 Allgemeines	3
2.1.2 Bildung und Vorkommen	5
2.1.3 Chemischer Aufbau	10
2.1.4 Physikalisch-chemische Eigenschaften	13
2.1.5 Biologische Eigenschaften	14
2.1.6 Höchstmengenregelungen in der Bundesrepublik Deutschland für Aflatoxine in Lebens- und Futtermitteln	16
2.1.7 Nachweismethoden für Aflatoxin M ₁ in Milch	18
2.1.7.1 Physikalisch-chemische Nachweismethoden	18
2.1.7.1.1 Dünnschichtchromatographie	18
2.1.7.1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie	19
2.1.7.2 Serologische Nachweismethoden	20
2.1.7.2.1 Radioimmunoassay	20
2.1.7.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	21
2.1.7.3 Vergleich verschiedener Nachweisverfahren	24
3 Eigene Untersuchungen	25
3.1 Grundlage und Prinzip der Vereinfachung des enzymimmunologischen Nachweises von Aflatoxin M ₁ in Milch	25
3.2 Material und Methodik für die Durchführung des heterologen enzymimmunologischen Nachweisver- fahrens	27
3.3 Versuche zur Neutralisation von Aflatoxin M ₁ mit spezifischem Antiserum in Abhängigkeit von der Serumkonzentration und Inkubationszeit	30
3.3.1 Material und Methodik	31
3.3.2 Ergebnisse	31
3.4 Untersuchungen zur Signifikanz der Extinktions- differenz in Abhängigkeit von der Toxin- konzentration	36
3.4.1 Material und Methodik	36
3.4.2 Ergebnisse	37

3.5	Orientierende Untersuchungen im Hinblick auf die praktische Anwendung des semiquantitativen Nachweisverfahrens	47
3.5.1	Nachweis von Aflatoxin M ₁ in künstlich kontaminierter Milch	47
3.5.1.1	Material und Methodik	47
3.5.1.2	Ergebnisse	48
3.5.2	Nachweis von Aflatoxin M ₁ in natürlich kontaminierter Milch	51
3.5.2.1	Material und Methodik	51
3.5.2.2	Ergebnisse	52
3.6	Untersuchungen zur Rationalisierung des semi- quantitativen Nachweisverfahrens	56
3.6.1	Material und Methodik	56
3.6.2	Ergebnisse	61
3.7	Untersuchungen zur Herstellung eines "AFM ₁ - ELISA-Screening-Kits"	64
3.7.1	Material und Methodik	64
3.7.2	Ergebnisse	66
4	Diskussion	75
5	Zusammenfassung/Summary	82
6	Literatur	86

1 Einleitung

Die Kontamination der Milch mit dem Aflatoxin M_1 (AFM_1) ist in der Regel auf das Verfüttern Aflatoxin B_1 -haltiger Futtermittel an laktierende Rinder zurückzuführen. Der Verzehr AFM_1 -haltiger Milch oder daraus hergestellter Milcherzeugnisse kann die menschliche Gesundheit gefährden, da dieses Mykotoxin mutagen und karzinogen ist. Als besondere Risikogruppe sind dabei Säuglinge und Kleinkinder anzusehen, da ihre Ernährung zum überwiegenden Teil auf Milch und Milcherzeugnissen beruht.

Zur Abwendung der Gefahr hat der Gesetzgeber für bestimmte Lebens- und Futtermittel Höchstmengen für Aflatoxine festgesetzt. Die futtermittelrechtlichen Höchstmengen sind insofern von besonderer Bedeutung, als für Milch und Milcherzeugnisse noch keine rechtsgültigen Höchstmengenregelungen getroffen wurden. Die in einem Vorentwurf einer 1. Verordnung zur Änderung der Aflatoxin-Verordnung geplante Einbeziehung von Grenzwerten für AFM_1 in Milch und Milcherzeugnissen kann eine weitere Verbesserung des Verbraucherschutzes vor gesundheitlicher Gefährdung durch die Aflatoxine gewährleisten.

Grundlegende Voraussetzung für eine wirkungsvolle Durchführung der Aflatoxin-Verordnung sind geeignete Analyseverfahren zur Bestimmung des Aflatoxingehaltes im ng/kg-Bereich. Der routinemäßige Nachweis von AFM_1 wird hauptsächlich mit der Dünnschicht- und Hochdruckflüssigkeitschromatographie geführt. Dazu sind aufwendige Extraktions- und Reinigungsschritte notwendig. In neuerer Zeit werden auch enzymimmunologische Verfahren angewendet. Ihre Vorteile liegen in der einfachen Probenaufbereitung, hohen Empfindlichkeit und der Möglichkeit zur Automatisierung.

Da bei der Einhaltung aller futtermittelrechtlichen Vorschriften die lebensmittelrechtlich angestrebten Normen nur in seltenen Fällen überschritten werden dürften, kann die Effektivität der amtlichen Untersuchungen weiter gesteigert werden, wenn aus dem anfallenden Probenmaterial mit einem vereinfachten enzymimmunologischen Verfahren die AFM_1 -haltigen Milchproben vorselektiert werden. Beschränkt man die quantitative Bestimmung des AFM_1 -Ge-



haltes, sei es mit einer physikalisch-chemischen oder einer enzymimmunologischen Methode, auf die vorselektierten AFM₁-haltigen Milchproben können die Kosten sowie der Arbeits- und Zeitaufwand für Überwachung und Monitoring reduziert werden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Nachweisverfahren zur semiquantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in Milch erarbeitet werden. Die Methode soll mit höchster Empfindlichkeit schon geringe AFM₁-Konzentrationen anzeigen und eine Schätzung des Toxingehaltes ermöglichen. Gleichzeitig soll das Verfahren kostengünstig und einfach durchführbar sein.

2 Schriftum

2.1 Aflatoxin M_1

2.1.1 Allgemeines

Milch zählt zu unseren wichtigsten Grundnahrungsmitteln. Besondere Bedeutung hat sie als Säuglings- und Kleinkindernahrung und als diätetisches Lebensmittel auf Milchpulverbasis. Der AFM_1 -Gehalt der Milch ist auf das Verfüttern aflatoxinhaltiger Futtermittel an laktierende Rinder zurückzuführen (Abb. 1).

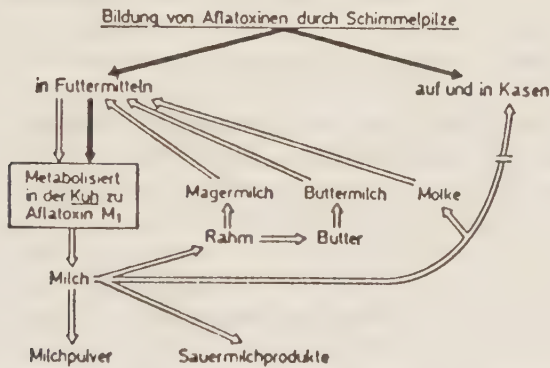


Abb. 1: Schematische Darstellung der Herkunft von Aflatoxinen in Milch und Milchprodukten. ■ = AFB_1 , AFG_1 ; □ = AFM_1 , AFM_2 (nach KIERMEIER, 1975)

Die Aflatoxingehalte in Futtermitteln für laktierende Kühe müssen so niedrig gehalten werden, was auch im Futtermittelrecht berücksichtigt wird, daß sich in der Milch dieser Tiere keine die menschliche Gesundheit gefährdende AFM_1 -Konzentrationen ergeben. Für bestimmte Lebensmittel sind in der Aflatoxin-Verordnung Höchstmengen an Aflatoxinen festgesetzt. Grenzwerte für AFM_1 in Milch und Milcherzeugnissen sind in dieser Verordnung noch nicht enthalten.

WOLLER (1981) beurteilt die Gesundheitsgefährdung durch Aflatoxine auf dem Milchsektor insgesamt als nicht besorgniserregend. Es sollten aber alle vertretbaren Anstrengungen unternommen werden, um den Kontaminationsgrad von Milch und Milcherzeugnissen noch weiter abzusenken. HEESCHEN et. al. (1986) konnten in den Jahren 1981 bis 1985 eine wesentliche Verbesserung auf dem Gebiet der fütterungsbedingten AFM₁-Gefährdung der Milch feststellen. Sie führen die günstige Entwicklung vor allem auf den weitgehenden Verzicht der Zumischung von Erdnuß, Baumwollsaat und einigen anderen Rohstoffen, die besonders häufig mit Aflatoxinen kontaminiert sind, zu Milchviehmischfuttermitteln zurück. ZIMMERLI und BLASER (1979) konnten nachweisen, daß durch die konsequente Verwendung erdnußfreier Milchviehmischfuttermittel das Grundnahrungsmittel Milch nahezu toxfrei gehalten werden kann.

In der Schweiz haben die Untersuchungen von MÜLLER (1984) ergeben, daß das Aflatoxin-Problem bei der Milch gelöst zu sein scheint. Dort wurde von den zuständigen Behörden zum einen die Verwendung von aflatoxinhaltigen Erdnußprodukten zur Milchviehfütterung verboten und zum anderen Grenzwerte für AFM₁ in Milch und Milcherzeugnissen festgesetzt.

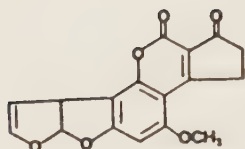
In einem Entwurf zur Änderung der Aflatoxin-Verordnung (1985) sollen jetzt auch in der Bundesrepublik Deutschland Grenzwerte für AFM₁ in Milch berücksichtigt werden. Ermöglicht wird die Festsetzung von Höchstmengen auf Grund der stetigen Verbesserung der Aflatoxinbestimmung im ng/kg-Bereich. Die Überprüfung geeigneter Bestimmungsverfahren wird zur Zeit in Ringversuchen durchgeführt bzw. vorbereitet.

Über das AFM₁ sind zahlreiche Veröffentlichungen erschienen. In der vorliegenden Literaturübersicht sollen daraus nur bestimmte Teilgebiete näher betrachtet werden. Weitergehende Informationen können u.a. folgenden Übersichtsarbeiten der letzten Jahre bzw. den dort zitierten Originalveröffentlichungen entnommen werden: MOREAU (1979), REISS (1981) und APPLEBAUM et. al. (1982).

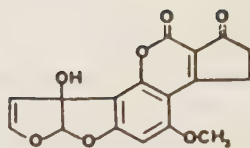
2.1.2 Bildung und Vorkommen

ALLCROFT und CARNAGHAN (1963) konnten in der Milch von Kühen, die verschimmelt, aflatoxinhaltiges Futter gefressen hatten, eine toxische Substanz feststellen, die bei Versuchstieren zu den gleichen pathologischen Leberveränderungen führte, wie sie durch Aflatoxine bekannt waren.

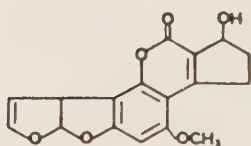
Diese toxische Substanz wurde, nach Verabreichen von reinem AFB_1 , auch in der Milch (DE IONGH, 1964) und in der Leber von Ratten (BUTLER und CLIFFORD, 1965) nachgewiesen. ALLCROFT et. al. (1966) isolierten das Toxin in Leber, Niere und Urin von Schafen, denen sie eine Aflatoxin-Mischung, bestehend aus den Komponenten B_1 , B_2 , G_1 und G_2 , gegeben hatten. Sie stellten gleichzeitig die Übereinstimmung mit dem von DE IONGH (1964) beschriebenen "Milchtoxin" fest. Auf ihren Vorschlag hin wurde dem Toxin, entsprechend dem Medium in dem es erstmals nachgewiesen werden konnte, der Name Aflatoxin M (=milk) gegeben. HOLZAPFEL et. al. (1966) entdeckte im Urin von Schafen zwei verschieden fluoreszierende Fraktionen, M_1 und M_2 , die Derivate des AFB_1 darstellen. Die Untersuchungen von MASRI et. al. (1967) zeigten, daß die Struktur des AFM_1 in der Milch von Kühen mit der des AFM_1 im Urin von Schafen identisch ist. Nach oraler Aufnahme von AFB_1 konnte das AFM_1 auch im Urin von Menschen (CAMPBELL et. al., 1979) und im Kot und Urin von Rhesusaffen (DALEZIOS et. al., 1973) nachgewiesen werden. Nur ein sehr geringer Teil des aufgenommenen AFB_1 wird unverändert wieder ausgeschieden. Der weitaus größere Teil wird durch cytoplasmatische und mikrosomale Enzyme in den Leberzellen metabolisiert (STOLOFF, 1980). Die dabei entstehenden Stoffwechselprodukte sind in der Abb. 2 dargestellt. Das AFM_1 entsteht durch Hydroxylierung am C-4 Atom des AFB_1 -Moleküls. Ausschlaggebend dafür ist die "Aflatoxin-4-Hydrolase-Aktivität" in den Mikrosomen der Leberzellen (SCHABORT und STEYN, 1969). Weiterhin konnten auch sulfuronidierte, glucuronidierte und an Proteine gebundene Hydroxy-Metabolite festgestellt werden. Man kann daraus schließen, daß ein Teil der aufgenommenen Aflatoxin-Ration in konjugierter Form ausgeschieden wird, analog zum Ausscheidungsmechanismus vieler anderer toxischer Substanzen (STOLOFF, 1980).



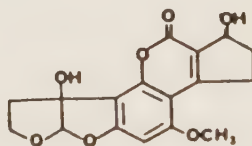
Aflatoxin B₁



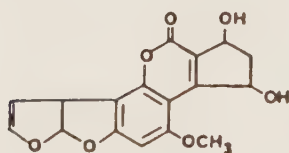
Aflatoxin M₁



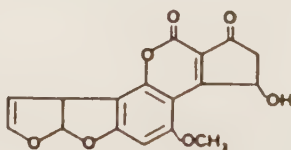
Aflatoxicol



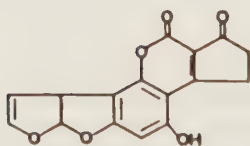
Aflatoxicol M₁



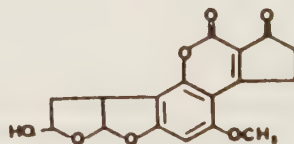
Aflatoxicol H₁



Aflatoxin Q₁



Aflatoxin P₁



Aflatoxin B_{2a}

Abb. 2: Chemische Struktur des AFB₁ und seiner Metabolite
(nach STOLOFF, 1980)

Einen umfassenden Überblick über die Ausscheidung von AFM_1 geben SIEBER und BLANC (1978). An dieser Stelle sollen nur kurz die wichtigsten Aspekte zusammengefaßt werden. Ungefähr 95% des aufgenommenen AFB_1 werden vermutlich in den Vormägen abgebaut oder resorbiert, zwei bis fünf Prozent erreichen den Darm. Bereits zwei Stunden nach der Aufnahme ist AFB_1 im Blut nachweisbar. Das AFM_1 kann schon fünf Stunden nach der Zufuhr von AFB_1 in der Milch festgestellt werden. Zwischen der Aufnahme von AFB_1 mit dem Futter und der Ausscheidung von AFM_1 in der Milch besteht eine lineare Beziehung (Abb. 3).

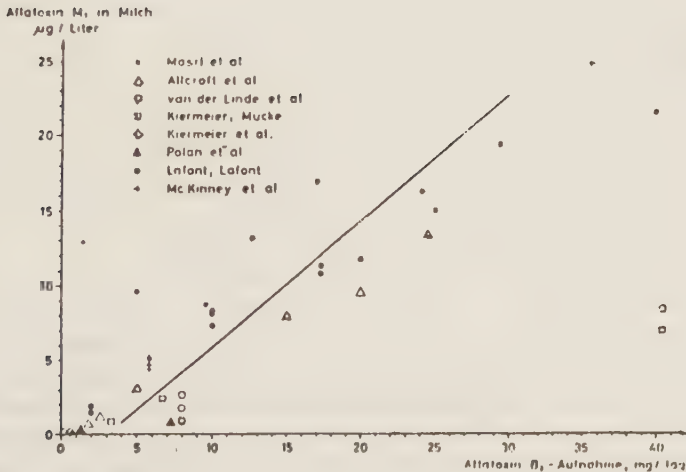


Abb. 3: AFM_1 -Gehalte in der Milch von Kühen, die unterschiedliche Mengen von AFB_1 erhielten (nach SIEBER und BLANC, 1978)

In der Tab. 1 sind die von verschiedenen Autoren ermittelten Ausscheidungsquoten von AFM_1 , bezogen auf den AFB_1 -Gehalt des Futters, zusammengefaßt. Die Werte liegen größtenteils unter zwei Prozent.

Tab. 1: Ausscheidung von AFM_1 in Abhängigkeit von der verzehrten AFB_1 -Menge bei Kuh und Schaf (aus SIEBER und BLANC, 1978; ergänzt nach PATTERSON et. al., 1980; DIJK et. al., 1984; PRICE et. al., 1984; FROBISH et. al., 1986)

Autor	Ausscheidung von AFM_1 in % bezogen auf den AFB_1 -Gehalt im Futter
NABNEY et. al., 1967 (Mutterschaf)	0,25
MASRI et. al., 1969	1,56 (0,5-3,9)
Kuh 2	2,37-3,94
NEUMANN-KLEINPAUL und TERPLAN, 1972	1,39
HOVERSLAND et. al., 1973	0,43-1,38
MC KINNEY et.al., 1973	
KIERMEIER, 1973	0,86
KIERMEIER und MÜCKE, 1974	0,18-0,39
POLAN et. al., 1974	0,00-0,30
LAFONT und LAFONT, 1975	0,78-0,90
ALLCROFT et. al., 1978	0,35
ENGEL und HAGEMEISTER, 1978	0,6
PATTERSON et. al., 1980	1,89-2,64
DIJK et. al., 1984	0,5-0,7
PRICE et. al., 1984	1,6
FROBISH et. al., 1986	1,74 (0,4-3,68)

Nach dem Absetzten der aflatoxinhaltigen Futterration oder nach nur einmaliger Gabe einer größeren Menge AFB_1 ist das AFM_1 noch bis zu 13 Tagen in der Milch zu finden. Da bislang ein Grenzwert für das AFM_1 in der Milch noch nicht erlassen wurde, sind bezüglich der Bundesrepublik Deutschland in der Literatur nur wenige Erhebungen über den Kontaminationsgrad der Milch zu finden. Die Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre sind entsprechend den Angaben in den Tab. 2 und 3 zusammengefaßt.

Tab. 2: AFM₁ in Milch und Milcherzeugnissen (nach KIERMEIER, 1985 und MAJERUS und WOLLER, 1985)

Erzeugnis (1978-1980)	Probenzahl (n)	AFM ₁ -haltig (n)	(%)	Autor	
Milch	99	1	1	MAJERUS/WOLLER	
Vollmilchpulver	39	15	38	"	"
Magermilchpulver	63	49	78	"	"
Kondensmilch	36	23	64	"	"
Quark	28	10	36	"	"
Gesamt (1978-1980)	283	98	35		
(1982-1984)					
Milch	124	4	3	MAJERUS/WOLLER	
Milchpulver	78	17	22	"	"
Kondensmilch	37	2	5	"	"
Quark	59	4	7	"	"
Säuglingsnahrung	92	-	-	"	"
Gesamt (1982-1984)	413	27	6		
(1980-1983)					
Milch	2958	259		KIERMEIER	
Milcherzeugnisse (Milchpulver, Kondensmilch, Säuglingsmilch- produkte)	321	86		"	
Butter	12	3		"	
Käse	558	235		"	
Gesamt (1980-1983)	3849	583			

Tab. 3: Entwicklung der Rückstände von AFM₁ in Milchproben aus der Bundesrepublik Deutschland seit 1981;
x_c/x_A in ng/kg (nach HEESCHEN et. al., 1986)

Zeitraum	Herdensammel-		Tankwagensammel-		Past. Trink- und	
	n	milch	n	milch	n	Werkmilch
1981	40	33,2/51,7	-	n.u. ^x	-	n.u. ^x
1982	103	25,8/29,3	314	21,1/25,3	9	48,8/54,9
1983	30	14,4/24,8	88	19,6/26,8	-	n.u. ^x
1984	214	7,8/12,9	19	12,8/16,4	168	10,8/16,7
1985	183	4,1/ 7,5	37	4,6/ 6,5	85	5,7/ 8,3

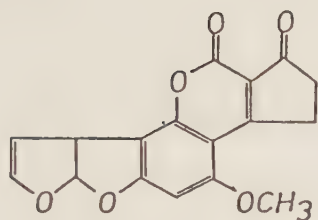
x = nicht untersucht

Zu beachten sind dabei auch jahreszeitliche Schwankungen des AFM₁-Kontaminationsgrades der Milch (POLZHOFFER, 1977; FRITZ, 1977; BLÜTHGEN, 1980). Sie sind auf den vermehrten Einsatz von Kraftfuttermitteln in den Wintermonaten zurückzuführen.

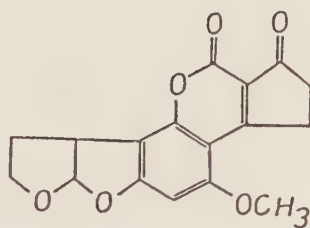
Der Vollständigkeit halber muß noch erwähnt werden, daß einige *Aspergillus flavus*-Stämme neben AFB₁ auch AFM₁ produzieren (PURCHASE und STEYN, 1968; REISS, 1981). Dies geschieht aber nur in sehr geringen Mengen. Für die Kontamination der Milch mit dem AFM₁ ist dies von untergeordneter Bedeutung.

2.1.3 Chemischer Aufbau

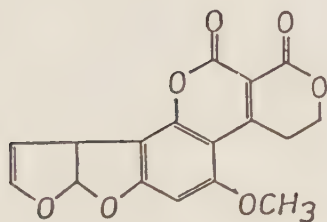
Die Aflatoxine lassen sich, je nach ihrer Grundstruktur, in die Toxine der "B"-Serie und die der "G"-Serie einteilen. Das Grundgerüst der "B"-Serie besteht aus einem Cumarinkern, der mit einem Bifuran verbunden ist und einem Pentanon als zyklisches Keton. Im Falle der "G"-Serie wird das Pentanon durch ein Laktonringsystem ersetzt. Von diesen Grundstrukturen, B₁ und G₁, lassen sich die anderen Aflatoxine ableiten. Die Strukturformeln der verschiedenen Aflatoxine sind in der Abb. 4 wiedergegeben.



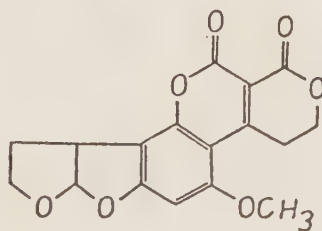
B₁



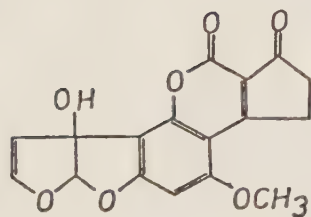
B₂



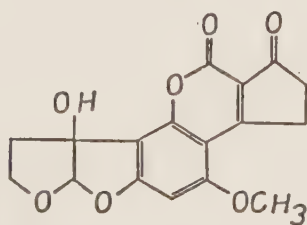
G₁



G₂



M₁



M₂

Abb. 4: Strukturformeln der Aflatoxine und des Aflatoxicols

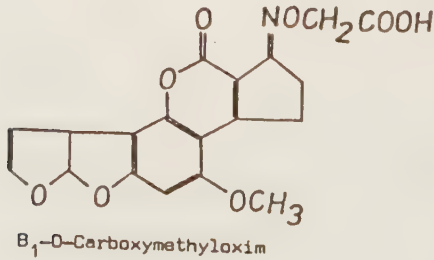
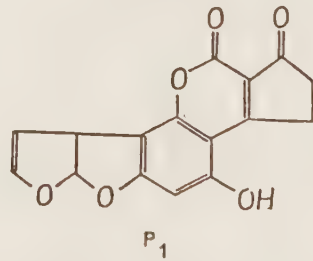
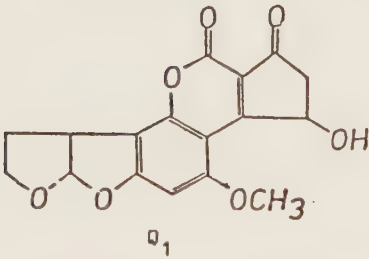
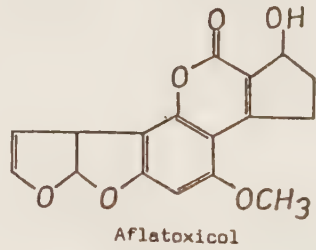
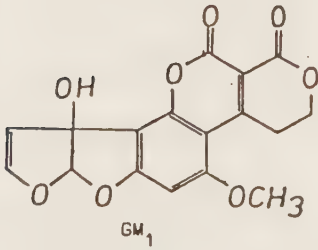
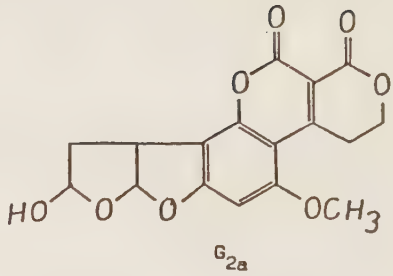
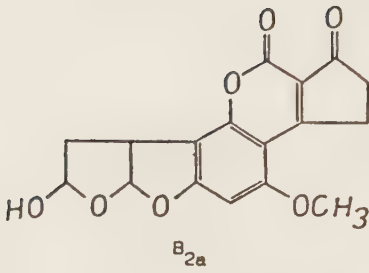


Abb. 4: Strukturformeln der Aflatoxine und des Aflatoxicols
(Fortsetzung)

2.1.4 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Aflatoxine können, auf Grund der in ihrem Grundgerüst vorkommenden konjugierten Doppelbindungen, UV-Strahlen absorbieren und die aufgenommene Energie als Fluoreszenz abstrahlen. Je nach Substitution des Grundgerüsts ergeben sich für die einzelnen Aflatoxintypen charakteristische Werte (Tab. 4; Abb. 5). Die folgenden Daten sind einer Übersicht von MOREAU (1979) entnommen.

Tab. 4: Wesentliche Charakteristika von Aflatoxinen

Aflatoxin	Summenformel	Molekulargewicht	Fluoreszenz	UV-Absorption (ϵ) (nm)	
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	blau	21800	(362)
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	blau	14700	(362)
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	grün	16100	(362)
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	grün	19000	(365)
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	blau-violett	19000	(357)
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	violett	21000	(357)

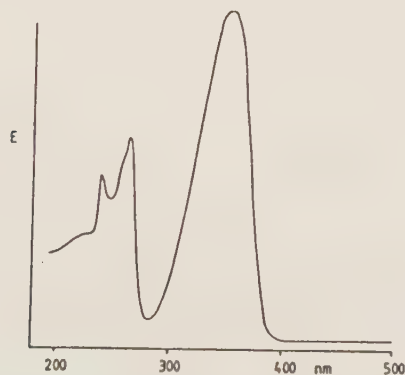


Abb. 5: Absorptionsspektrum einer AFM₁-Standardlösung (24,4 µg/ml) in Acetonitril (nach MILLER et. al., 1980)

2.1.5 Biologische Eigenschaften

Aflatoxine zählen zu den stärksten hepatotoxischen und cancerogenen Mykotoxinen. Die biologischen Eigenschaften der Aflatoxine sind, in Abhängigkeit zur verabreichten Dosis und Dauer der Aufnahme, unterschiedlich ausgeprägt. Sowohl innerhalb einer Tierart als auch zwischen verschiedenen Tierarten bestehen Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber den Aflatoxinen. Innerhalb einer Spezies sind die Unterschiede auf Rasse, Alter, Hormonsituation und Ernährungs- und Gesundheitszustand zurückzuführen (APPLEBAUM et. al., 1982)

Die verschiedenen Aflatoxine sind im Bezug auf ihre biologischen Eigenschaften nicht gleich zu bewerten. Der Vergleich der LD₅₀-Dosen einzelner Aflatoxintypen für Entenküken (Tab. 5) und der mutagenen und cancerogenen Aktivität verschiedener Aflatoxine und Aflatoxin-Metabolite (Tab. 6) zeigt, daß schon die geringfügigsten Änderungen am chemischen Grundgerüst der Aflatoxine die biologischen Eigenschaften beeinflussen.

Tab. 5: LD₅₀-Dosen verschiedener Aflatoxintypen für Entenküken
(nach MOREAU, 1979)

Aflatoxin	LD ₅₀ -Dosis (mg/kg)
B ₁	0,36
B ₂	1,69
G ₁	0,78
G ₂	3,45
M ₁	0,33
M ₂	1,24

Untersuchungen bei Entenküken (PURCHASE, 1967) und Ratten (WOGAN und PAGLIALUNGA, 1974) haben ergeben, daß das AFM₁ eine ähnlich hohe Toxizität wie das AFB₁ aufweist (Tab. 5). In Abhängigkeit von der aufgenommenen AFM₁-Dosis treten pathologische Leberveränderungen auf. Sie variieren zwischen geringfügigen Gallengangsproliferationen und Nekrosen (PURCHASE, 1967). Die carcinogene

Wirkung des AFM₁ wurde an Regenbogenforellen (SINNHUBER et. al., 1970; CANTON et.al., 1975) und Ratten (WOGAN und PAGLIALUNGA, 1974) nachgewiesen. Sie ist im Vergleich zu dem AFB₁ wesentlich geringer einzuschätzen (WONG und HSIEH, 1976; HSIEH und RUEBNER, 1984). Die mutagene Aktivität des AFM₁ beträgt etwa drei Prozent von der des AFB₁ (Tab. 6).

Tab. 6: Vergleich der mutagenen und carcinogenen Aktivität verschiedener Aflatoxine und Aflatoxin-Metabolite (nach WONG und HSIEH, 1976; WONG et.al., 1977)

Substanz	Relative Mutagenität in % (Ames-Test)	Carcinogenität
AFB ₁	100,0	stärkstes Lebercarcinogen bei Ratte und Regenbogenforelle
Aflatoxicol	22,8	besitzt die Hälfte der tumor- erzeugenden Aktivität des AFB ₁ gegenüber Regenbogenforelle
AFG ₁	3,3	bei Ratte und Regenbogenforelle schwächer tumorerzeugend als AFB ₁
AFM ₁	3,2	besitzt 1/3 der tumorerzeugen- den Aktivität des AFB ₁ gegen- über Regenbogenforelle
AFQ ₁	1,1	erzeugt bei Regenbogenforellen keine Tumore
AFB ₂	0,2	wirkungslos bei Ratte, schwach wirksam bei Regenbogenforelle
AFP ₁	0,1	
AFG ₂	0,2	erzeugt bei Regenbogenforelle keine Tumore
AFB ₂ α	0,0	
AFG ₂ α	0,0	

Die Gesundheitsgefährdung durch das AFB₁ ist, im Vergleich zu dem AFM₁, höher einzuschätzen. Auch wenn bei neugeborenen Kälbern, die sechs Wochen mit natürlich kontaminierter AFM₁-haltiger Milch gefüttert wurden, keine Anzeichen einer Aflatoxikose auftraten (DIJK et. al., 1984) oder bei Ratten, die über einen Zeitraum von 17 Monaten eine AFM₁-Haltige Futterration erhielten, keine pathologischen Leberveränderungen feststellbar waren (HSIEH und RUEBNER, 1984), darf man das Risiko durch das AFM₁ nicht verharmlosen. Vor allem Säuglinge und Kleinkinder sind auf Grund ihres geringen Körpergewichtes und ihrer fast ausschließlichen Ernährung mit Fertigpräparaten auf Milchpulverbasis als "Risikogruppe" zu betrachten. (FRANK, 1976; PATTERSON et. al., 1980).

2.1.6 Höchstmengenregelungen in der Bundesrepublik Deutschland für Aflatoxine in Lebens- und Futtermittel

In der am 1. März 1977 in Kraft getretenen Aflatoxin-Verordnung (Verordnung über Höchstmengen an Aflatoxinen in Lebensmitteln) vom 30.11.1976 (BGBl I S. 3313) wurden für die Bundesrepublik Deutschland erstmals Höchstwerte für Aflatoxine in Lebensmitteln festgelegt. Damit sollte der gesundheitsgefährdenden Bedeutung der Aflatoxine Rechnung getragen werden. In der Verordnung werden Höchstmengen für die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ in bestimmten, erfahrungsgemäß am stärksten kontaminierten Lebensmitteln berücksichtigt. Das AFM₁ bzw. Milch und Milcherzeugnisse werden in der Verordnung nicht reglementiert.

In einem Entwurf einer 1. Verordnung zur Änderung der Aflatoxin-Verordnung vom 14. November 1985 wird jetzt auch eine Höchstmengenregelung für das AFM₁ angestrebt. Milch soll danach weder unvermischt noch nach Vermischen als Lebensmittel in den Verkehr gebracht oder zur Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden, wenn sie mehr als 50 ng AFM₁/l enthält. Milch die zur Herstellung von Säuglings- und Kleinkindernahrung verwendet wird, darf nicht mehr als 10 ng AFM₁/l enthalten. Milcherzeugnisse dürfen nicht aus Milch hergestellt werden, deren Gehalte die vorstehenden Grenzwerte überschreiten. Während einer Übergangszeit von zwei Jahren soll der Höchstwert von AFM₁ in Milch, die zur Herstellung

von Säuglings- und Kleinkindernahrung verwendet wird, auf 20 ng AFM₁/l festgesetzt werden.

Auch für Aflatoxine in Futtermitteln gelten Höchstmengenregelungen. Damit soll zum einen der Verbraucher vor aflatoxinhaltigen Lebensmitteln tierischen Ursprunges geschützt werden und zum anderen die Gesundheit der Tiere sichergestellt werden (MÜCKE und SCHULZE, 1981). § 23 Abs. 1 der Futtermittelverordnung vom 8. April 1981 (BGBl I S.352), zuletzt geändert durch die vierte Verordnung vom 23. Januar 1985 (BGBl I S. 170), legt auf Grund einer Ermächtigung des Futtermittelgesetzes vom 2. Juli 1975 (BGBl I S. 1745) in der Anlage 5 Höchstgehalte für das AFB₁ in bestimmten Futtermitteln fest. In der Tab. 7 sind die getroffenen Höchstmengenregelungen, bezogen auf Futtermittel mit 88 v.H. Trockenmasse, aufgeführt.

Tab. 7: Höchstmengen für AFB₁ in Futtermitteln nach der Futtermittelverordnung der Bundesrepublik Deutschland

Futtermittel	Höchstgehalt in mg/kg
Einzelfuttermittel	0,05
Alleinfuttermittel für Kälber, Schafe und Ziegenlämmer	0,01
Alleinfuttermittel für laktierende Rinder, laktierende Schafe und laktierende Ziegen	0,01
Andere Alleinfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen	0,05
Alleinfuttermittel für Schweine und Geflügel	0,02
Andere Alleinfuttermittel	0,01
Ergänzungsfuttermittel für Schwein und Geflügel	0,03

2.1.7 Nachweismethoden für AFM₁ in Milch

Der routinemäßige Nachweis von AFM₁ in Milch wird hauptsächlich mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden geführt. In neuerer Zeit werden auch serologische Verfahren angewendet. Alle Methoden müssen höchste Empfindlichkeit aufweisen, um auch noch Toxin-Konzentrationen im unteren ppt-Bereich sicher nachweisen zu können. Gleichzeitig sollen sie schnell, einfach und kostengünstig durchführbar sein.

2.1.7.1 Physikalisch-chemische Nachweismethoden

Die physikalisch-chemischen Nachweisverfahren basieren auf den charakteristischen physikalischen bzw. chemischen Eigenschaften der Aflatoxine. Zur quantitativen Bestimmung werden z.B. die UV-Absorption oder die fluoreszierenden Eigenschaften ausgenutzt. Allgemein umfassen die quantitativen Bestimmungsverfahren von AFM₁ folgende Arbeitsschritte: a) Probenentnahme, b) Extraktion der Aflatoxine, c) Reinigungsschritte zum Entfernen störender Substanzen, d) Auftrennung der Aflatoxine und e) qualitative und quantitative Bestimmung.

2.1.7.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die am häufigsten angewendete Methode zum Nachweis von AFM₁ in Milch ist die Dünnschichtchromatographie (DC). Sie ist als Standardmethode international anerkannt. Die in der Literatur beschriebenen Techniken unterscheiden sich häufig nur durch unterschiedliche Probenaufbereitung. Die Aflatoxine werden in der Regel mit organischen Lösungsmitteln aus der Probe extrahiert. Der Extrakt wird dann, z.B. durch Säulenchromatographie, von störenden Substanzen gereinigt. Bei der folgenden DC werden die Probenextrakte auf Kieselgelplatten aufgetragen und mit unterschiedlichen Laufmitteln entwickelt. Die qualitative Auswertung erfolgt durch den Vergleich der R_F-Werte mit den parallel angesetzten Toxinstandards und die Farbe des fluoreszierenden Lichtes bei der Betrachtung unter langwelligem Licht. Das Ergebnis kann durch Derivatbildung mit Trifluoressigsäure bestätigt werden. Die quantitative Ermittlung des AFM₁-Gehaltes wird direkt auf der

Platte mit Hilfe eines Fluorodensitometers durchgeführt. Sicherere Ergebnisse lassen sich mit der zweidimensionalen DC erzielen.

In der amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 35 LMBG sind zwei Verfahren zum Nachweis von AFM_1 in Milch und Milchprodukten aufgeführt. Bei der Schuller-Methode wird das AFM_1 mit Aceton aus der Milch extrahiert. Der Rohextrakt wird durch Flüssig-flüssig-Verteilung gereinigt. Nach zweidimensionaler DC wird das AFM_1 unter UV-Licht identifiziert. Das Ergebnis wird durch Derivatbildung mit Trifluoressigsäure bestätigt. Die quantitative Bestimmung erfolgt durch fluorodensitometrische Messung direkt auf der Platte. Die Nachweisgrenze der Schuller-Methode liegt bei 10 ng AFM_1 /kg. Bei der anderen beschriebenen Methode wird das AFM_1 mit einem Dichlormethan/Aceton-Gemisch aus der sorgfältig homogenisierten Probe extrahiert. Der Rohextrakt wird säulenchromatographisch gereinigt. Die qualitative und quantitative Auswertung entspricht im Prinzip der Schuller-Methode. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 10 ng AFM_1 /kg.

2.1.7.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der HPLC wird eine säulenchromatographische Trennung unter Hochdruck durchgeführt. Kleinkalibrige Stahlrohre werden mit der stationären Phase gepackt und die mobile Phase unter Druck durch die Säulen gepreßt. Die Zeit für die Trennung wird reduziert und das Verfahren liefert genauere Ergebnisse. Ein Nachteil dieser Methode liegt in dem größeren apparativen Aufwand. Als Maß für die qualitative Auftrennung der Aflatoxine dient die Retentionszeit und zur quantitativen Bestimmung wird ein Fluoreszenz-Detektor eingesetzt. Die Extraktions- und Reinigungsschritte sind mit denen bei den DC-Verfahren vergleichbar.

HPLC-Verfahren zum Nachweis von AFM_1 wurden u.a. von ZIMMERLI (1977), WINTERLIN et. al. (1979), TUINSTRA und HAASNOOT (1982) und CHANG und DE VRIES (1983) beschrieben. Die Nachweisgrenzen liegen im unteren ppt-Bereich.

2.1.7.2 Serologische Nachweisverfahren

In den letzten Jahren ist es gelungen gegen niedermolekulare Mykotoxine spezifische Antikörper zu gewinnen. Mit der Verfügbarkeit dieser Antikörper konnten einfach und schnell durchführbare serologische Nachweisverfahren entwickelt werden. Das Prinzip des Radioimmunoassay (RIA) und des Enzymimmunoassay (EIA) beruht auf der Konkurrenz zwischen unmarkierten, in der Probe enthaltenen Toxin und dem radioaktiv- bzw. enzymmarkierten Toxin des Testsystems um spezifische Bindungsstellen des Antikörpermoleküls. Die Empfindlichkeit des Verfahrens wird entscheidend von der spezifischen Aktivität des markierten Toxins und der Affinität der Antikörper beeinflusst.

2.1.7.2.1 Radioimmunoassay (RIA)

Das Prinzip eines RIA ist schematisch in der Abb. 6 dargestellt. Eine Versuchsprobe des unmarkierten Antigens (offene Kreise) wird mit einer konstanten, bekannten Menge des gleichen Antigens, das vorher radioaktiv markiert wurde (schwarze Kreise), zusammengebracht. Zu der Mischung wird eine begrenzte Menge des Antikörpers gegeben. Die Menge der hinzugegebenen Antikörper muß so gewählt werden, daß ein Überschuß an markierten Antigenen bleibt, auch wenn kein unmarkiertes Antigen vorhanden ist. Da die Menge der Antikörper begrenzt ist, wird die Zahl der markierten Antigene, die sich an die Antikörper bindet, umgekehrt proportional der Zahl der vorhandenen unmarkierten Antigene sein. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird, z.B. durch eine Immunpräzipitation, von freiem Antigen getrennt und die Radioaktivität des unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplexes gemessen. Der Toxingehalt wird mittels einer Standardkurve bestimmt (COOPER, 1981).

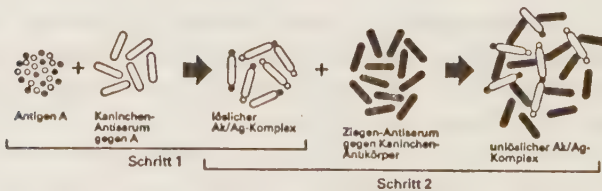


Abb. 6: Reaktionen während eines RIA (aus COOPER, 1981)

PESTKA et.al. (1981) beschreiben einen RIA zur Bestimmung von AFM₁. Die Empfindlichkeit liegt in dem Bereich zwischen 5 und 50 ng pro Probe. Nach Extraktion und Reinigungsschritt wird eine Nachweisgrenze von 0,5 ng/ml erreicht. QUIAN et. al. (1984) gibt als Nachweisgrenze weniger als drei ppt an.

2.1.7.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das Prinzip der kompetitiven enzymimmunologischen Nachweismethoden beruht auf dem Konkurrieren zwischen einer zu bestimmenden mit einer gleichen, jedoch enzymmarkierten Substanz um freie Bindungsstellen eines gemeinsamen Reaktionspartners. Das Ergebnis der Konkurrenz ist mit Hilfe der enzymatischen Reaktionen meßbar und ermöglicht eine quantitative Aussage. Die folgenden Ausführungen über enzymimmunologische Arbeits- und Nachweismethoden sind von MÄRTLBAUER (1985) übernommen.

Die Anordnung der verschiedenen enzymimmunologischen Methoden kann, je nach Fragestellung und technischen Voraussetzungen, variieren. Die Systematik der Enzymimmunoassays ist in der Abb. 7 zusammengefaßt. Bei den homogenen Enzymimmunoassays wird die Enzymaktivität durch die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflusst. Somit ist keine Trennung von freiem und gebundenem Toxin notwendig. Im Gegensatz dazu wird bei den heterogenen Enzymimmunoassays die Enzymaktivität nicht durch die Bindung an den Antikörper beeinflusst. Deshalb müssen die freien und gebundenen Reaktionspartner getrennt werden. Dies geschieht durch die Adsorption eines Reaktionspartners an eine feste Oberfläche. Nicht gebundene Reagenzien werden jeweils durch einen Waschschrift entfernt.

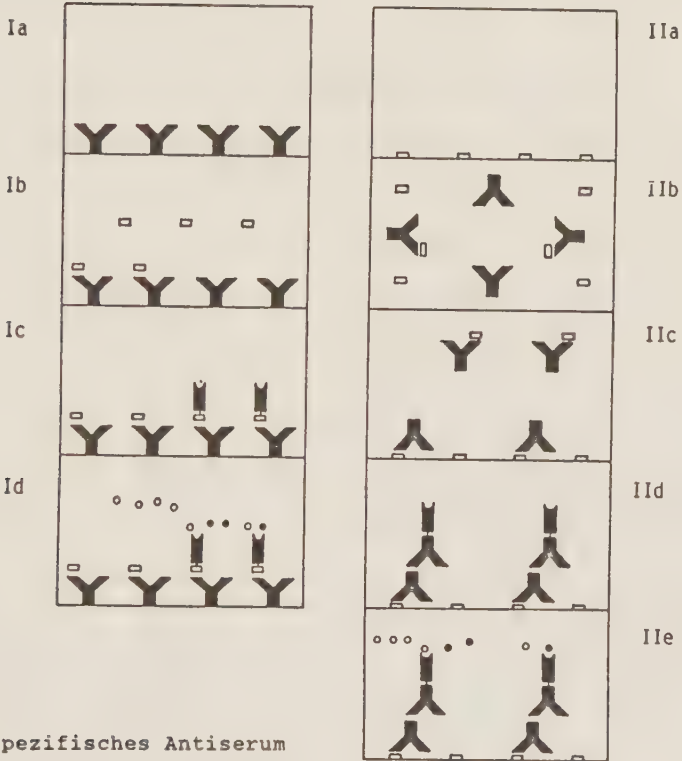
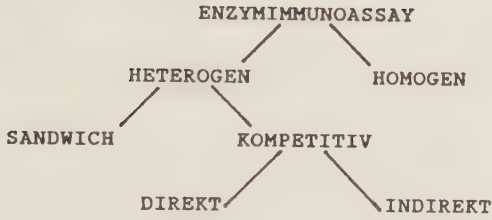
Für den Nachweis von Mykotoxinen werden hauptsächlich heterogene Verfahren in direkter oder indirekter Anordnung verwendet. Beides sind kompetitive Verfahren, d.h. daß entweder freies und enzymmarkiertes Toxin (direkt) oder freies und an die Festkörperphase gebundenes Toxin (indirekt) um die Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren.

Bei dem direkten Verfahren (Abb. 7, I) wird das für das entsprechende Toxin spezifische Antiserum an einer Polystyroloberfläche adsorbiert (Abb. 7, Ia). Im zweiten Schritt wird entweder Toxinstandard oder die Probe zugegeben. Dabei wird ein Teil der Antikörper-Bindungsstellen besetzt (Abb. 7, Ib). Die restlichen Bindungsstellen werden dann im dritten Schritt von dem enzymmarkierten Toxin besetzt (Abb. 7, Ic). Die Menge des gebundenen enzymmarkierten Toxins kann anhand des Substratumsatzes gemessen werden und ist umgekehrt proportional der Konzentration des freien Toxins (Abb. 7, Id).

Bei dem indirekten Verfahren (Abb. 7, II) wird zunächst das entsprechende Toxin (Toxin-Protein-Konjugat) an Polystyrol adsorbiert (Abb. 7, IIa). Das spezifische Antiserum wird mit der Probe oder dem Toxinstandard inkubiert (Abb. 7, IIb) und im dritten Schritt binden sich dann die noch freien Antikörper an das adsorbierte Toxin (Abb. 7, IIc). Durch die Zugabe eines zweiten Antikörpers (Abb. 7, IId), der mit Enzym markiert und spezifisch für Immunglobulin ist, kann dann nach Substratzugabe die Menge der gebundenen Antikörper bestimmt werden, die wiederum umgekehrt proportional der Toxinkonzentration ist (Abb. 7, IIe).

Prinzipiell kann bei beiden Verfahren, sowohl bei dem direkten als auch bei dem indirekten Enzymimmunoassay, ein Arbeitsgeang eingespart werden, wenn man die Probe bzw. Toxinstandards und enzymmarkiertes Toxin gleichzeitig mit dem Antikörper inkubiert. Man bezeichnet dieses Verfahren als simultan, im Gegensatz zu dem beschriebenen titrimetrischen oder konsekutiven Verfahren.

Zu unterscheiden sind auch noch homologe und heterologe Enzymimmunoassays. Bei dem homologen ELISA ist das enzymmarkierte Toxin identisch mit dem freien Toxin in der Probe, während bei dem heterologen ELISA ein Hapten zur Kopplung an das Enzym verwendet wird, dem mindestens eine funktionelle Gruppe des Toxins, welches nachgewiesen werden soll, fehlt. Der spezifische Antikörper bindet das homologe Toxin-Enzym-Konjugat stärker als das freie Toxin. Durch die Verwendung eines heterologen Toxin-Enzym-Konjugates wird dieses Ungleichgewicht verringert.



Y = spezifisches Antiserum

□ = Toxin

° ° ° ° = Enzymsubstrat

• • = Enzymsubstrat nach enzymatischer Reaktion



= enzymmarkiertes Toxin

= enzymmarkierter Antikörper

Abb. 7: Systematik der Enzymimmunoassay (nach MÄRTLBAUER, 1985)

PESTKA et. al. (1981) beschreibt einen homologen, kompetitiven, direkten ELISA in simultaner Anordnung. Die Nachweisgrenze für AFM₁ in Milch liegt bei 250 ppt. HU et. al. (1984) sowie FREMY und CHU (1984) konnten die Nachweisgrenze, durch eine Konzentrierung der Proben, auf 15 ppt (HU et. al., 1984) bzw. 10 ppt (FREMY und CHU, 1984) steigern. MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) haben einen heterologen, kompetitiven enzymimmunologischen Nachweis von AFM₁ in Milch und Milchpulver entwickelt. Bei diesem Verfahren liegt die Nachweisgrenze bei 2,5 ppt.

2.1.7.3 Vergleich verschiedener Nachweisverfahren

In der folgenden Tabelle (Tab. 8) sind einige Nachweisverfahren sowie deren Nachweisgrenzen aufgeführt.

Tab. 8: Verfahren zum Nachweis von AFM₁

STUBBLEFIELD und SHANNON, 1974	DC	100 ppt
TUINSTRA und BRONGEEST, 1975	DC	4 ppt
STUBBLEFIELD, 1979	DC	100 ppt
FUKAYAMA et. al., 1980	DC	300 ppt
INTERNATIONALER IMV-STANDARD, 1982	DC	100 ppt
STEINER und BATTAGLIA, 1983	DC	3-5 ppt
SERRALHEIRO und QUINTA, 1985	DC	300-500 ppt
SERRALHEIRO und QUINTA, 1986	DC	0,3 ng/spot
COHEN et. al., 1984	LC	80 ppt
FERGUSON-FOOS und WARREN, 1984	LC	30 ppt
STUBBLEFIELD und KWOLEK, 1986	LC	10-70 ppt
ZIMMERLI, 1977	HPLC	0,05-0,2 ng/Inj.
WINTERLIN et. al., 1979	HPLC	100 ppt
TUINSTRA und HAASNOOT, 1982	HPLC	5 ppt
CHANG und DE VRIES, 1983	HPLC	14 ppt
QIAN et. al., 1984	HPLC	10 ppt
PESTKA et. al., 1981	ELISA	250 ppt
HU et. al., 1984	ELISA	15 ppt
FREMY und CHU, 1984	ELISA	10 ppt
MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985	ELISA	2,5 ppt
PESTKA et. al., 1981	RIA	500 ppt
QIAN et. al., 1984	RIA	3 ppt

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Grundlage und Prinzip des semiquantitativen Nachweisverfahrens von AFM₁ in Milch

Die Grundlage dieser Arbeit bildet der von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebene ELISA zum Nachweis von AFM₁ in Milch und Milchpulver. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen heterologen, kompetitiven ELISA in konsekutiver Anordnung (vgl. 2.1.7.2.2). Freies und enzymmarkiertes Toxin werden nacheinander mit dem spezifischen, an eine Festkörperphase adsorbierten Antikörper inkubiert. Die Menge des gebundenen, enzymmarkierten Toxins kann anhand des Substratumsatzes gemessen werden und ist umgekehrt proportional der Konzentration des freien Toxins. Die quantitative Auswertung erfolgt mit Hilfe eines ELISA-Autoreaders (Dynatech), der die Extinktionen der Proben und Toxinstandards bei einer bestimmten Wellenlänge mißt. Nach den ermittelten Werten der Toxinstandards wird eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Toxingehalte der Proben bestimmt werden. Hohe Extinktionswerte stehen für niedrige Toxinkonzentrationen, niedrige Extinktionswerte für hohe Toxingehalte.

Gibt man, wie beim Ansatz eines indirekten ELISA, spezifische Antikörper zu einer toxinhaltigen Probe, wird das AFM₁-Molekül unter Bildung eines stabilen Antigen-Antikörper-Komplexes gebunden (Abb. 8, Ib+c). Bei der, wie oben beschriebenen, enzymimmunologischen Bestimmung des Toxingehaltes wird der Anteil des so gebundenen Toxins nicht erfasst. Die normalerweise von freiem Toxin belegten Bindungsstellen des an die Microelisaplatte adsorbierten Antikörpers bleiben frei (Abb. 8, Id+e) und werden erst im nächsten Schritt von den enzymmarkierten Toxinen besetzt (Abb. 8, If). Dementsprechend wird mehr Substrat umgesetzt (Abb. 8, Ig). Der ermittelte Toxingehalt der Proben ist um den Anteil des im Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Toxins reduziert. Im Idealfall, wenn alle AFM₁-Moleküle neutralisiert werden, ergibt der enzymimmunologische Nachweis von AFM₁ ein negatives Ergebnis; es ist kein Toxin nachweisbar.

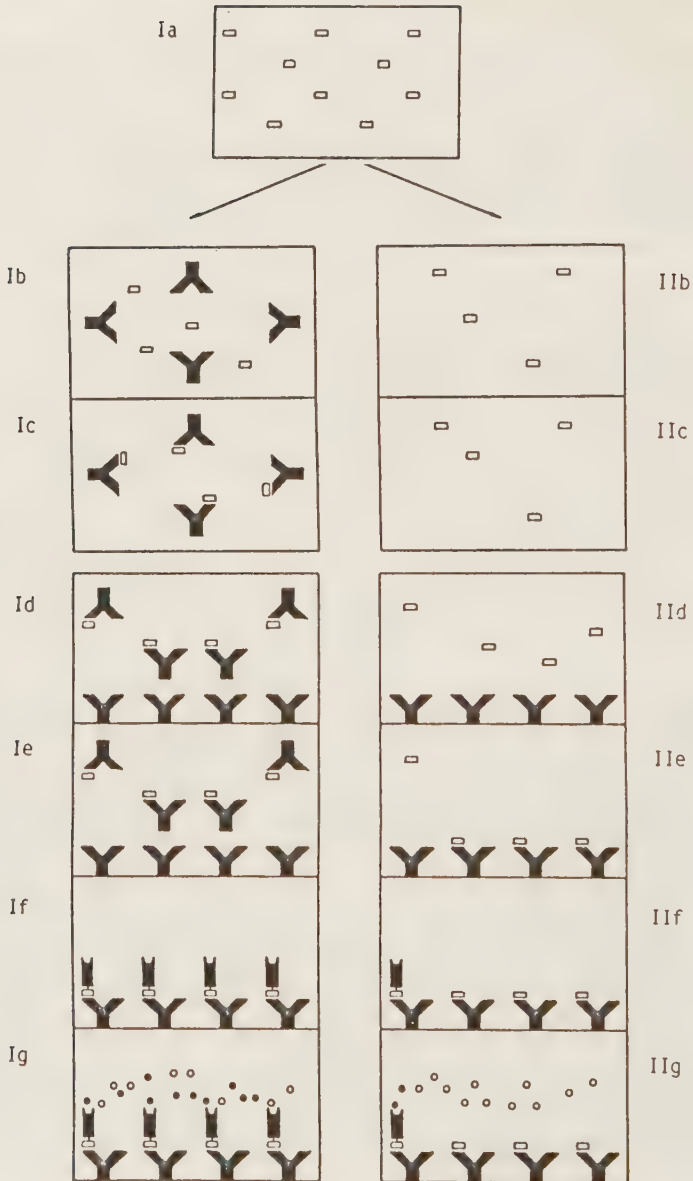


Abb. 8: Prinzip des semiquantitativen Nachweisverfahrens von AFM₁ in Milch (Zeichenerklärung vgl. Abb. 7)

Teilt man eine Milchprobe, deren Toxingehalt bekannt ist, zu gleichen Anteilen auf (Abb. 8) und gibt zu dem einen Teil der Probe spezifische Antikörper (Abb. 8, Ib, zu dem anderen Teil aber nicht (Abb. 8, IIb), ergibt die Ermittlung der Extinktion zwei verschiedene Werte (Abb. 8, I+II d-g). Die Extinktionsdifferenz ist auf den reduzierten Toxingehalt des Probenanteiles zurückzuführen, der mit spezifischen Antikörpern inkubiert wurde. Bei der quantitativen Bestimmung wird im Idealfall in dem Probenanteil, der mit spezifischen Antikörpern inkubiert wurde, kein Toxin festgestellt, während der Toxingehalt des anderen Probenanteiles dem erwarteten, vorher bekannten Wert entspricht.

Das Prinzip des semiquantitativen Nachweisverfahrens von AFM_1 in Milch beruht auf der Ermittlung von Extinktionsdifferenzen. Sie sind immer dann zu erwarten, wenn das Probenmaterial aflatoxinhaltig ist und ein Teil der Probe durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern toxinfrei gemacht werden kann, während in dem anderen Teil der Probe der AFM_1 -Gehalt unverändert bleibt.

3.2 Material und Methodik für die Durchführung des heterologen enzymimmunologischen Nachweisverfahrens

An dieser Stelle werden die zur Durchführung des enzymimmunologischen Nachweisverfahrens von AFM_1 in Milch verwendeten Materialien zusammenfassend aufgeführt und die Durchführung beschrieben. Die zu den einzelnen Versuchen und Untersuchungen gemachten Angaben beziehen sich auf die hier aufgeführten Reagenzien und Materialien. Änderungen, die sich aus der jeweiligen Fragestellung ergeben, werden in den einzelnen Abschnitten beschrieben. Sofern die Herkunft der verwendeten Chemikalien nicht ausdrücklich angegeben ist, wurden sie von der Firma Merck in der Reinheitsstufe p.A. bezogen.

Es wurden folgende Materialien benützt:

- Aflatoxin M_1 (AFM_1), (Sigma)
- Aflatoxin B_1 (AFB_1), (Sigma)
- Fetales Kälberserum (FCS), (Sigma)

-Spezifisches anti-AFM₁-Antiserum

Das spezifische , gegen AFM₁ gerichtete Antiserum stammt aus der institutseigenen Produktion (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985). Das Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem AFM₁-Humanserumalbumin-Konjugat gewonnen.

-Enzymmarkiertes AFB₁

Für den heterologen ELISA wurde ein AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat aus ebenfalls institutseigener Produktion verwendet. Die Herstellung des Konjugates erfolgte mittels der aktiven Estermethode (MÄRTLBAUER, 1987)

-Carbonat-Bicarbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,4-9,8)

-Phosphatpuffer (PBS), (0,01 mol/l mit 0,12 mol/l Natriumchlorid, pH 7,0-7,5).

Nach Zusatz von 1% fetalem Kälberserum (FCS, Sigma) wurde der Puffer als 1% FCS/PBS bezeichnet.

-Handelsübliche, entrahmte Milch (0,3% Fett)

-Rohmilch (ab Hof)

Der AFM₁-Gehalt der verwendeten entrahmten Milch sowie der Rohmilch wurde enzymimmunologisch bestimmt. Für die Untersuchungen wurde nur AFM₁-freie Milch eingesetzt.

-Enzym-Substrat zur Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität (1mmol 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol)

-H₂O₂-Puffer (0,21 mol/l, pH 3,9-4,0)

44,129g Citronensäure-Monohydrat + 200 ml 1mol/l KOH ad ein Liter Aqua dest. + 3,15 mmol H₂O₂ (lichtgeschützt bei 15-25°C einige Wochen haltbar).

-Enzym-Substratlösung

(20 Teile H₂O₂-Puffer (10 ml) und ein Teil Enzymsubstrat (0,5ml))

-1 mol/l H₂SO₄

-Waschlösung

0,15 mol/l NaCl + 0,25 Tween 20 auf einen Liter Aqua dest.

-Nunc-Immuno-Platten I 96 F (Nunc-GmbH)

-Nunc-TSP-Platten (Nunc GmbH)

-Eppendorf Varipette 4710, 10 - 100µl

-Eppendorf Varipette 4710, 101 - 1000 µl

-Eppendorf Standartips 1 - 101 µl und 101 - 1000 µl

-Einmal-Reagenzgläser (Servoprax)

-Diverse Glaswaren

- Rüttler Vortex Genie 2 (Bender und Hobein)
- Taumelgerät (Heidolf)
- ELISA-Autoreader (Dynatech)
- Personal-Computer HP 85 B (Hewlett-Packard)
- Präzisionswaage (Satorius)
- Photometer Shimadzu UV 160 (Shimadzu Corporation)
- Kühlzentrifuge Variofuge RF (Haeraeus-Christ-GmbH)
- Tiefgefrierschrank Leros Scientific (New Brunswick Scientific)
- Gefriertrocknungsanlage GT 2 (Leybold Haeraeus)

Das anti-AFM₁-Antiserum wurde portionsweise (0,5 ml) lyophilisiert und entsprechend zur Anwendung mit 0,5 ml Aqua dest. gelöst. Nicht verbrauchtes, aber gelöstes Antiserum wurde bis zur weiteren Verwendung eingefroren gelagert. Zur Beschichtung der Microelisaplaten wurde eine Vorverdünnung (1:100 in PBS) hergestellt und bei 4°C gelagert. Zur Durchführung der Untersuchungen wurde das Antiserum der Charge AS II 15 verwendet.

Das AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat wurde 1:100 mit 1%FCS/PBS vorverdünnt und portionsweise (0,5 ml) lyophilisiert. Nach Lösen des Konjugates mit 0,5 ml Aqua dest. wurde es innerhalb von zwei Wochen aufgebraucht oder portioniert eingefroren. Für den konsekutiven ELISA wurde es 1:400 mit 1% FCS/PBS weiterverdünnt (Endverdünnung 1:40000).

Die AFM₁-Stammlösung (20 ng AFM₁/ml) diente zur Herstellung der verschiedenen Toxinstandards. AFM₁ wurde in Acetonitril gelöst und die Toxin-Konzentration mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt:

$$S = \frac{E_{\max} * M * 1000}{\epsilon * \delta}$$

E_{max} = aus der Adsorptionskurve ermittelter, maximaler Extinktionswert im Bereich 330 - 335 nm

M = molare Masse von AFM₁ (328)

ε = molarer Extinktionskoeffizient von AFM₁ in Acetonitril (19850)

δ = Schichtdicke der Mikroküvette in cm

S = AFM₁-Gehalt

Die Stammlösung wurde lichtgeschützt in Braunglasflaschen bei 4°C aufbewahrt. Bei längerer Lagerung wurde die Toxinkonzentration der Stammlösung regelmäßig kontrolliert.

Der heterologe, konsekutive ELISA wurde wie folgt durchgeführt: Das anti-AFM₁-Antiserum wurde mit dem Carbonat-Bicarbonatpuffer 1:6000 verdünnt. Davon wurden je 100 µl in die Kavitäten einer Microelisaplatte (Nunc-GmbH) pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Absättigung wurden in jede Kavität 200 µl entrahmte Milch pipettiert und bei Raumtemperatur auf einem Taumelgerät (Heidolf) inkubiert. Nach 30-40 Minuten wurde die Platte dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Dann wurden die Standardlösungen und Proben (100 µl/Kavität) zugegeben, 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Taumelgerät inkubiert und anschließend abgesaugt. Die Platte wurde wieder dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Darauf wurde in jede Kavität 100 µl AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat, das vorher mit 1% FCS/PBS 1:40000 verdünnt wurde, pipettiert und die Platte wieder eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Taumelgerät inkubiert. Anschließend wurde sie dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Das Enzymsubstrat wurde zugegeben (100 µl/Kavität), nach ausreichender Farbentwicklung die Reaktion mit 100 µl 1 molarer H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Der mit dem ELISA-Autoreader verbundene Computer berechnete aus den Parallelwerten Mittelwerte und Standardabweichung. Aus den Mittelwerten der Toxinstandards wurde eine Standardkurve erstellt und die Probenkonzentrationen durch Interpolation ermittelt.

3.3 Versuche zur Neutralisation von AFM₁ mit spezifischem Antiserum in Abhängigkeit von Serumkonzentration und Inkubationszeit

Spezifische, gegen AFM₁-gerichtete Antikörper können unter Bildung stabiler Antigen-Antikörper-Komplexe AFM₁-Moleküle neutralisieren. Es sollte das Neutralisationsvermögen in Abhängigkeit von Serumkonzentration und Inkubationszeit untersucht werden.

3.3.1 Material und Methodik

Ausgehend von der AFM₁-Stammlösung (20 ng AFM₁/ml) wurden sieben Standardkonzentrationen mit einem Toxingehalt von 1,37 bis 1000 pg AFM₁/ml in entrahmter Milch hergestellt. Das anti-AFM₁-Antiserum wurde mit PBS 1:2700, 1:900, 1:300 und 1:100 verdünnt. In Parallelansätzen wurden jeweils 900 µl der Toxinstandards mit 100 µl der verschiedenen anti-AFM₁-Antiserumverdünnungen eine, zwei und vier Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze im Enzymimmunologischen Test (vgl. 3.2) eingesetzt. Der Substratumsatz, der umgekehrt proportional der Toxinkonzentration ist, wurde durch Messung der Extinktion mit einem ELISA-Autoreader ermittelt. Die Extinktionswerte der Toxinstandards wurden mit denen einer gleichzeitig angesetzten toxinfreien Milchprobe (900 µl toxinfreie, entrahmte Milch + 100 µl PBS) verglichen und der Unterschied in Prozent berechnet.

3.3.2 Ergebnisse

Der Extinktionswert der toxinfreien Milchprobe (Nullprobe) wurde mit 100% festgesetzt. Die ermittelten Extinktionswerte der verschiedenen Probenansätze wurden prozentual zu der Extinktion der Nullprobe berechnet. In den Abb. 9-11 sind die einzelnen AFM₁-Standardkurven, die sich nach Zugabe der verschiedenen Anti-AFM₁-Antiserumverdünnungen zu den einzelnen AFM₁-Toxinstandards und unterschiedlicher Inkubationsdauer ergeben, graphisch dargestellt. Die Toxinkonzentrationen sind an der x-Achse logarithmisch aufgetragen, die y-Achse gibt die Extinktionswerte (in %) an. Die Standardpunkte (o) wurden durch Interpolation nach Augenmaß unter Verwendung eines biegsamen Lineals zu einer möglichst glatten Kurve verbunden.

Es zeigt sich, daß das Neutralisationsvermögen des spezifischen, gegen AFM₁-gerichteten Serums von der jeweiligen Verdünnung beeinflusst wird. Je höher das anti-AFM₁-Antiserum verdünnt wird, desto niedriger ist die Bindungskapazität der spezifischen Antikörper. Bei den mit der 1:2700 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung inkubierten AFM₁-Toxinstandards können nur Toxingehalte bis zu 37 pg AFM₁/ml neutralisiert werden. Die Grenzwerte der 1:900 und

1:300 anti-AFM₁-Antiserumverdünnungen liegen bei 111 und 333 pg AFM₁/ml. Die einstündige Inkubation der AFM₁-Standards mit der 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung ergibt selbst noch bei 1000 pg AFM₁/ml eine nahezu vollständige Neutralisation aller AFM₁-Moleküle. Der ermittelte Extinktionswert (98,2%) entspricht in etwa dem der toxinfreien Nullprobe (=100%). Das Neutralisationsvermögen wird durch die ein-, zwei- oder vierstündige Inkubation mit dem Probenmaterial nicht beeinflusst. Die ermittelten Extinktionsmittelwerte (in %) für die verschiedenen AFM₁-Standards weichen bei unterschiedlich langer Inkubationsdauer nur unwesentlich voneinander ab.

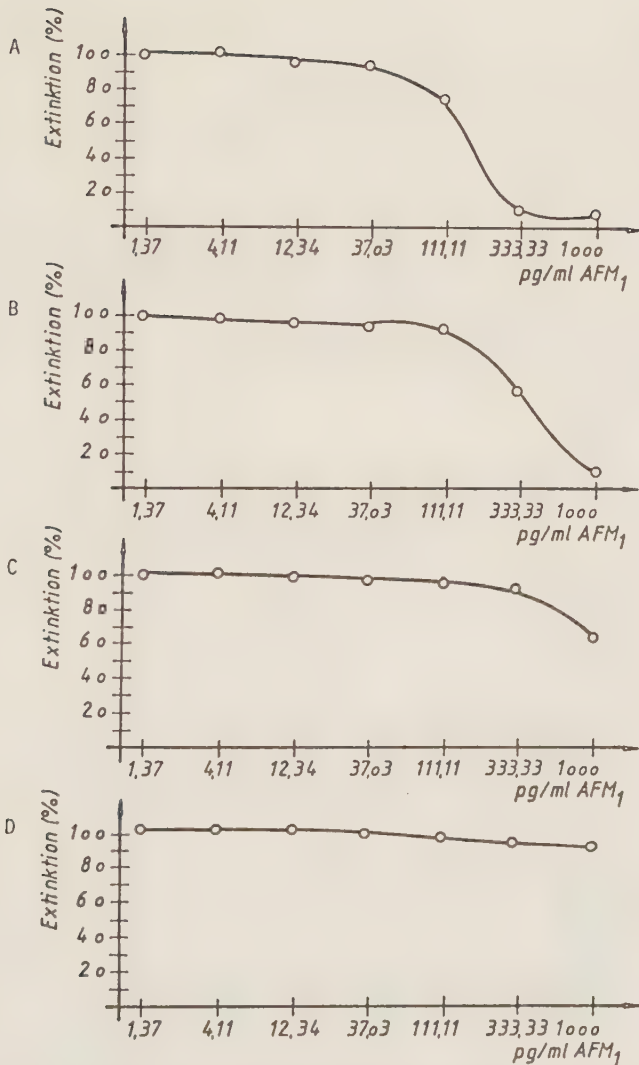


Abb. 9: Verlauf der AFM₁-Standardkurven nach einstündiger Inkubation der AFM₁-Standardkonzentrationen mit einer 1:2700 (A), 1:900 (B), 1:300 (C) und 1:100 (D) anti-AFM₁-Antiserumverdünnung

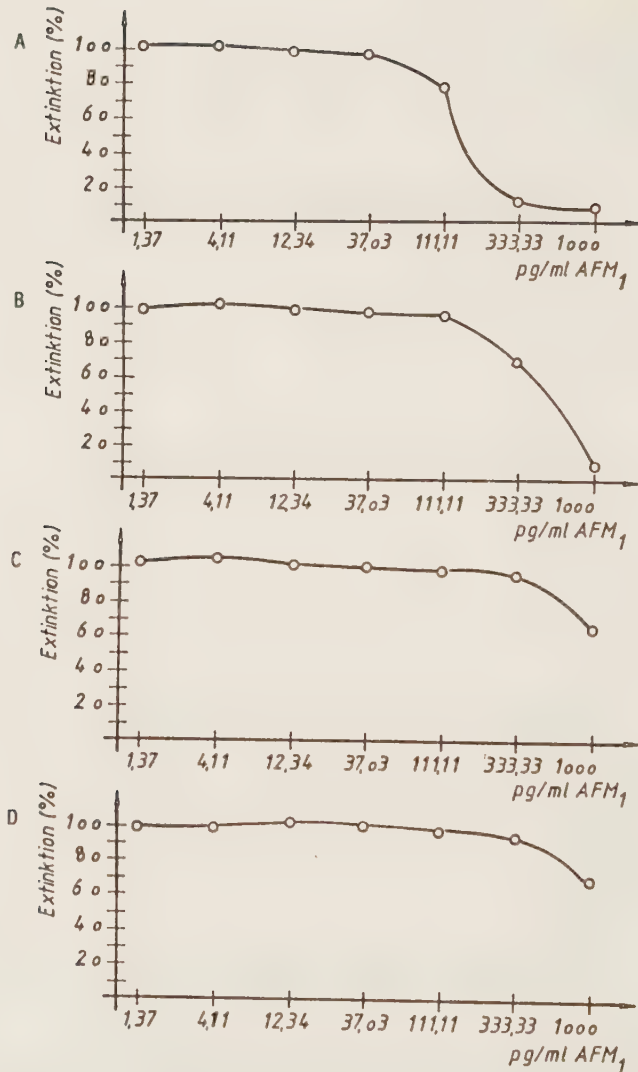


Abb. 10: Verlauf der AFM₁-Standardkurven nach zweistündiger Inkubation der AFM₁-Standardkonzentrationen mit einer 1:2700 (A), 1:900 (B), 1:300 (C) und 1:100 (D) anti-AFM₁-Antiserumverdünnung

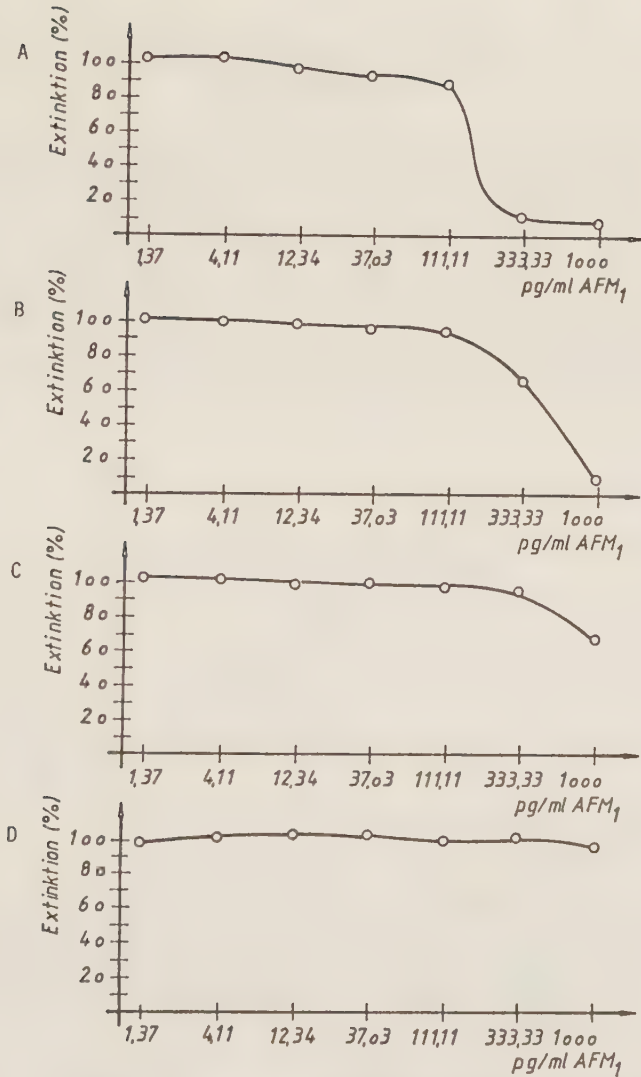


Abb. 11: Verlauf der AFM₁-Standardkurven nach vierstündiger Inkubation der AFM₁-Standardkonzentrationen mit einer 1:2700 (A), 1:900 (B), 1:300 (C) und 1:100 (D) anti-AFM₁-Antiserumverdünnung

3.4 Untersuchungen zur Signifikanz der relativen Extinktion in Abhängigkeit von der Toxinkonzentration

Bei dem heterologen, kompetitiven ELISA ist der ermittelte Extinktionswert umgekehrt proportional der Toxinkonzentration. Zwischen der Extinktion einer toxinfreien Probe und einer AFM_1 -haltigen Milchprobe besteht dementsprechend eine Differenz. Im linearen Teil der AFM_1 -Standardkurve kann jedem Extinktionswert eine bestimmte Toxinkonzentration und eine auf den Nullwert bezogene relative Extinktion zugeordnet werden (Abb. 12). Mit zunehmenden Toxingehalt wird die Differenz zwischen toxinfreier und toxinhaltiger Probe größer.

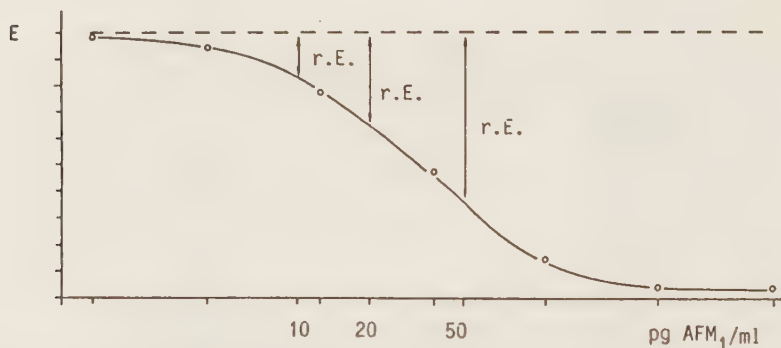


Abb. 12: AFM_1 -Standardkurve

Es sollte untersucht werden, ob zwischen der relativen Extinktion verschiedener AFM_1 -Toxinstandards signifikante Unterschiede bestehen. Die AFM_1 -Konzentrationen der verschiedenen Toxinstandards wurden unter Berücksichtigung der vorgesehenen Grenzwerte für AFM_1 in Milch festgesetzt.

3.4.1 Material und Methodik

Die zur Ermittlung der relativen Extinktion (r.E.%) in entrahmter Milch hergestellten Standards hatten einen Toxingehalt von 0, 10, 20 und 50 pg AFM_1 /ml. Die einzelnen Standards wurden zu gleichen

Mengen aufgeteilt. Ein Teil der Standards sollte toxisch gemacht werden. Dazu wurden zu jeweils 900 µl des Standards 100 µl einer 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung pipettiert und der Probenansatz eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (vgl. 3.3.1). Im anderen Teil der Probe sollte die AFM₁-Konzentration unverändert bleiben. Dieser Probenanteil (900 µl) wurde nach Zugabe von 100 µl PBS ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Probenpaare (Toxinstandard + anti-AFM₁-Antiserumverdünnung / Toxinstandard + PBS) im enzymimmunologischen Verfahren eingesetzt und die Extinktionswerte ermittelt. Der Extinktionswert des mit der 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung inkubierten Probenanteiles wurde mit 100% festgesetzt und der Wert des mit PBS inkubierten Toxinstandards prozentual dazu berechnet (relative Extinktion = r.E.%).

3.4.2 Ergebnisse

Die Auswertung der ermittelten relativen Extinktionswerte (r.E.%) erfolgte mittels eines Statistikprogrammes. In der Tab. 9 sind die Mittelwerte der r.E.% der vier untersuchten AFM₁-Standards nach Untersuchungstag und einzelnen Microelisaplaten aufgeführt. Die relative Häufigkeit der errechneten Einzelwerte (n=538 pro AFM₁-Standard) für die vier AFM₁-Standards ist in den Abb. 12-15 abgebildet. Es zeigt sich, daß sich die errechneten r.E.-%-Werte für die vier AFM₁-Standards unterscheiden, wobei mit steigendem Toxingehalt die Differenz zum Nullwert ansteigt. Aus den Abb. 12 - 15 läßt sich ablesen, daß sich die Einzelwerte der 0, 20 und 50 pg AFM₁/ml-Standards jeweils pyramidenförmig um den Mittelwert verteilen, während die Werte für den 10 pg AFM₁/ml-Standard im Bereich des Mittelwertes (72,46) einen breiten Block ergeben (67,5-77,49). Im Histogramm aller Einzelwerte (Abb. 16) ergibt sich dementsprechend ein dreigipfeliges Bild.

Zur Klärung der Frage, ob zwischen den ermittelten r.E.-%-Werten der vier AFM₁-Standards signifikante Unterschiede bestehen, wurde mit allen Einzelwerten ein F-Test durchgerechnet (Ergebnis in Tab. 10). Außer dem unterschiedlichen AFM₁-Gehalt der Standards wurde auch der Einfluß der verschiedenen Untersuchungstage und Microelisaplaten berücksichtigt. Zwischen den r.E.-%-Werten der verschiedenen AFM₁-Standards bestehen signifikante Unterschiede.

Gleichzeitig ergeben sich auch signifikante Unterschiede für die verschiedenen Untersuchungstage und Microelisaplatten.

Tab. 9: Ergebnisse der Untersuchungen zur Signifikanz der relativen Extinktion in % (r.E.%) in Abhängigkeit von der Toxinkonzentration

Tag	Platte	AFM ₁ -Konz. (pg/ml)	r.E.%	s	n
1	1	0	100.42	5.46	10
	1	10	76.08	4.24	10
	1	20	64.55	7.09	10
	1	50	38.85	2.72	10
1	2	0	96.92	6.17	10
	2	10	73.83	3.96	10
	2	20	64.23	6.89	10
	2	50	39.61	2.54	10
1	3	0	97.61	3.86	10
	3	10	72.22	5.45	10
	3	20	59.43	4.53	10
	3	50	35.47	3.16	10
1	4	0	97.63	4.01	10
	4	10	75.43	3.04	10
	4	20	63.05	2.99	10
	4	50	40.72	3.88	10
1	5	0	98.06	9.24	10
	5	10	71.38	5.88	10
	5	20	54.94	6.24	10
	5	50	36.01	3.17	10
2	1	0	100.4	5.24	8
	1	10	72.50	2.19	8
	1	20	60.96	5.53	8
	1	50	41.92	1.59	8
2	2	0	96.07	5.03	40
	3	10	75.36	3.84	40
	4	20	61.45	3.17	40
	5	50	37.60	3.85	40

Fortsetzung Tab. 9:

Tag	Platte	AFM ₁ -Konz. (pg/ml)	r.E.%	s	n
3	1	0	105.10	11.39	8
	1	10	82.05	6.87	8
	1	20	53.59	6.07	8
	1	50	35.25	4.68	8
3	2	0	90.73	1.51	4
	2	10	79.98	5.85	4
	2	20	64.43	10.04	4
	2	50	40.80	5.33	4
3	3	0	99.41	5.49	8
	3	10	73.65	4.20	8
	3	20	64.86	2.10	8
	3	50	47.21	4.61	8
3	4	0	98.95	8.32	8
	4	10	75.99	6.81	8
	4	20	61.29	3.36	8
	4	50	40.11	4.27	8
3	5	0	93.25	3.76	8
	5	10	68.90	4.69	8
	5	20	57.71	2.58	8
	5	50	43.63	2.95	8
4	1	0	98.88	4.78	10
	1	10	76.49	5.81	10
	1	20	62.20	4.20	10
	1	50	46.55	4.22	10
4	4	0	99.15	3.34	10
	4	10	82.81	3.66	10
	4	20	65.51	3.95	10
	4	50	46.02	4.03	10
4	5	0	100.73	5.86	4
	5	10	73.10	10.25	4
	5	20	55.18	3.96	4
	5	50	33.58	1.47	4

Fortsetzung Tab. 9:

Tag	Platte	AFM ₁ -Konz. (pg/ml)	r.E.%	s	n
5	1	0	92.82	5.35	40
	2	10	64.30	10.30	40
	3	20	49.61	3.68	40
	4	50	33.92	2.80	40
6	1	0	97.20	6.55	40
	2	10	66.21	4.55	40
	3	20	63.03	5.21	40
	4	50	36.42	2.94	40
6	5	0	95.41	4.40	40
	6	10	69.69	5.06	40
	7	20	61.60	4.61	40
	8	50	42.52	5.08	40
7	1	0	91.48	4.34	10
	1	10	67.84	3.97	10
	1	20	50.69	5.13	10
	1	50	37.28	2.68	10
7	2	0	85.09	4.74	10
	2	10	64.79	4.06	10
	2	20	53.49	3.78	10
	2	50	36.93	9.51	10
7	3	0	91.81	3.46	10
	3	10	74.00	4.39	10
	3	20	59.46	4.19	10
	3	50	37.76	3.52	10
7	4	0	93.04	2.93	10
	4	10	73.01	2.53	10
	4	20	64.58	4.06	10
	4	50	44.83	2.34	10
7	5	0	92.23	4.60	40
	6	10	70.12	3.81	40
	7	20	54.62	6.06	40
	8	50	32.52	3.29	40

Fortsetzung Tab. 9:

Tag	Platte	AFM ₁ -Konz. (pg/ml)	r.E.%	s	n
8	1	0	95.84	5.87	40
	2	10	73.79	4.74	40
	3	20	61.14	4.28	40
	4	50	36.35	4.57	40
8	5	0	101.45	5.64	10
	5	10	81.47	4.75	10
	5	20	66.07	4.39	10
	5	50	41.26	3.10	10
8	6	0	99.99	3.88	10
	6	10	83.34	5.51	10
	6	20	64.34	5.63	10
	6	50	37.78	2.48	10
8	7	0	95.27	5.31	10
	7	10	75.08	5.38	10
	7	20	62.88	5.39	10
	7	50	35.67	1.83	10
8	8	0	96.56	4.06	10
	8	10	76.93	4.93	10
	8	20	59.82	1.53	10
	8	50	35.93	3.23	10
9	1	0	97.79	6.24	40
	2	10	76.41	6.22	40
	3	20	61.96	3.46	40
	4	50	37.19	3.54	40
9	5	0	93.39	6.79	10
	5	10	69.88	6.38	10
	5	20	52.70	3.25	10
	5	50	33.80	3.35	10
9	6	0	94.95	4.40	10
	6	10	71.12	4.91	10
	6	20	55.14	4.67	10
	6	50	31.92	3.21	10

Fortsetzung Tab. 9:

Tag	Platte	AFM ₁ -Konz. (pg/ml)	r.E.%	s	n
9	7	0	97.58	5.67	10
	7	10	71.20	3.35	10
	7	20	55.59	4.70	10
	7	50	32.96	2.77	10
9	8	0	96.74	2.85	10
	8	10	71.81	3.76	10
	8	20	56.04	4.03	10
	8	50	31.40	2.06	10
1	1-5	0	98.13	5.94	50
		10	73.79	4.79	50
		20	61.24	6.63	50
		50	38.13	3.64	50
2	1+2	0	96.79	5.27	48
		10	74.88	3.76	48
		20	61.37	3.59	48
		50	38.32	3.92	48
3	1-5	0	98.24	8.50	36
		10	75.68	7.24	36
		20	59.93	6.25	36
		50	41.47	5.86	36
4	1-5	0	97.16	4.78	44
		10	76.20	6.98	44
		20	59.93	6.25	44
		50	43.86	6.01	44
5	1	0	92.82	5.35	40
	2	10	64.30	10.30	40
	3	20	49.61	3.68	40
	4	50	33.92	2.80	40
6	1+5	0	96.30	5.62	80
	2+6	10	67.94	5.09	80
	3+7	20	62.31	4.95	80
	4+8	50	39.47	5.14	80

Fortsetzung Tab. 9:

Tag	Platte	AFM ₁ -Konz. (pg/ml)	r.E.%	s	n
7	1-5	0	91.29	4.82	80
	1-4+6	10	70.02	4.58	80
	1-4+7	20	56.96	6.33	80
	1-4+8	50	35.86	5.93	80
8	1+5-8	0	97.08	5.67	80
	2+5-8	10	76.49	6.02	80
	3+5-8	20	62.21	4.72	80
	4+5-8	50	37.00	4.08	80
9	1+5-8	0	96.73	5.81	80
	2+5-8	10	73.71	6.08	80
	3+5-8	20	58.41	5.25	80
	4+5-8	50	34.85	3.99	80
1-9	alle	0	95.89	6.10	538
		10	72.46	7.08	538
		20	59.68	6.38	538
		50	37.73	5.44	538

Tab. 10: Untersuchungsergebnisse zur Ermittlung der Signifikanz der relativen Extinktionswerte in Abhängigkeit des Toxingehaltes der AFM₁-Standards (F-Test)

	Freiheitsgrade	Summe der Abweichungs- quadrate	F-Wert	p
Tag	8	13061.54	65.00	0.0001
Platte (Tag)	41	11566.94	11.23	0.0001
Toxin	3	318049.21	4220.45	0.0001

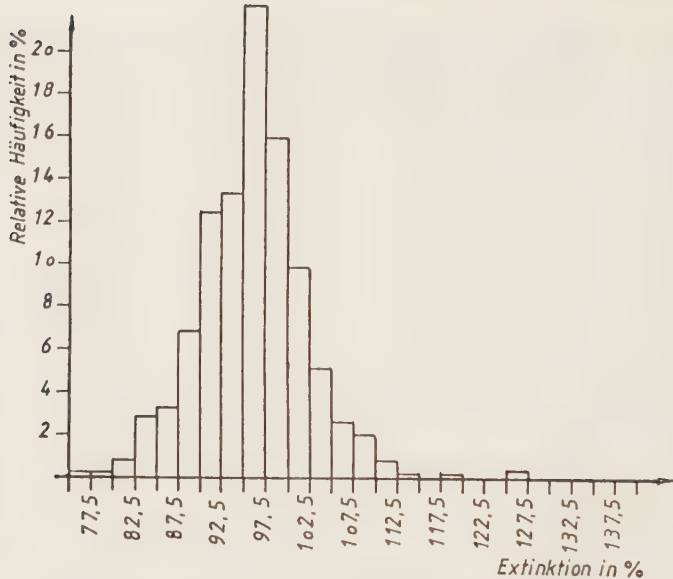


Abb. 12: Relative Häufigkeit (in %) der errechneten Extinktionswerte (r.E.%; n=538) für den toxinfreien Standard

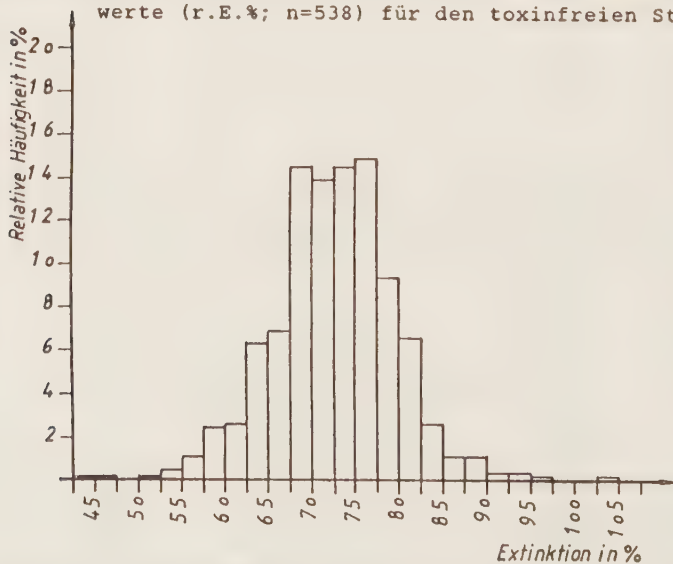


Abb. 13: Relative Häufigkeit (in %) der errechneten Extinktionswerte für einen 10 pg-Toxinstandard (10 pg AFM₁/ml)

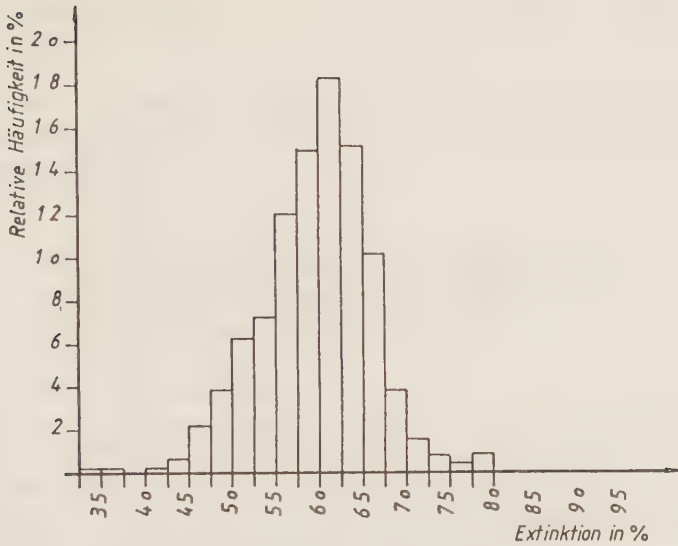


Abb. 14: Relative Häufigkeit (in %) der errechneten Extinktionswerte für einen 20 pg-Toxinstandard (20 pg AFM₁/ml)

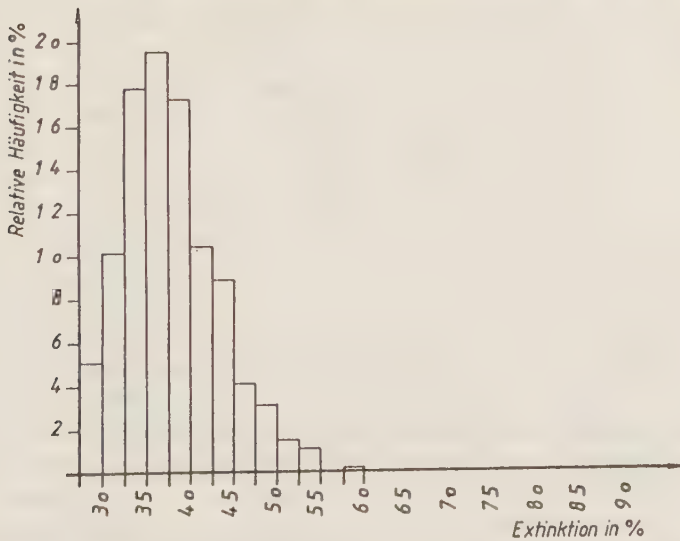


Abb. 15 : Relative Häufigkeit (in %) der errechneten Extinktionswerte für einen 50 pg-Toxinstandard (50 pg AFM₁/ml)



Abb. 16: Histogramm aller errechneten Extinktionswerte (n=2152)

3.5 Orientierende Untersuchungen im Hinblick auf die praktische Anwendung des semiquantitativen Nachweisverfahrens

Es sollte geprüft werden, inwieweit die Ermittlung relativer Extinktionen eine Beurteilung über den AFM₁-Gehalt in der Milch von Kühen ermöglicht.

3.5.1 Nachweis von AFM₁ in künstlich kontaminierter Milch

3.5.1.1 Material und Methodik

Für die Untersuchungen wurde frische, AFM₁-freie Rohmilch verwendet. Der AFM₁-Gehalt der Rohmilch wurde quantitativ, mittels ELISA überprüft. Mit der AFM₁-freien Rohmilch und der AFM₁-Stamm-lösung wurden die zu untersuchenden Proben und Standards hergestellt. Die Toxingehalte der einzelnen Proben sind in der Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: AFM₁-Gehalte (pg/ml) der verschiedenen Proben

Proben-Nummer	pg AFM ₁ /ml	Proben-Nummer	pg AFM ₁ /ml
1; 13; 25	500	2; 14; 26	100
3; 15; 27	75	4; 16; 28	50
5; 17; 29	40	6; 18; 30	30
7; 19; 31	25	8; 20; 32	20
9; 21; 33	15	10; 22; 34	10
11; 23; 35	5	12; 24; 36	0

Bei den zur Abschätzung des AFM₁-Gehaltes eingesetzten AFM₁-Standards betrug die Toxinkonzentration 0, 10, 20 und 50 pg AFM₁/ml Rohmilch. Nach Zugabe der jeweiligen AFM₁-Menge zu der Rohmilch wurden die Proben und Standards in einer Kühlzentrifuge (Variofuge RF, Haeraeus-Christ GmbH) bei 4°C zehn Minuten mit 4000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Die Rahmschicht wurde mit einer Pasteurpipette durchstoßen und die entrahmte Milch in ein anderes Reagenzglas überführt. Die Proben und Standards wurden analog zu 3.4.1 in zwei gleiche Mengen (900 µl) aufgeteilt und nach Zugabe

von 100 µl der 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung bzw. 100 µl PBS eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben- und Standardpaare (Probe bzw. Standard + anti-AFM₁-Antiserumverdünnung / Probe bzw. Standard + PBS) ohne weitere Aufbereitung nach einem festgelegten Schema auf die vorbereitete Microelisaplatte pipettiert (200 µl/Kavität). Das enzymimmunologische Verfahren wurde wie unter 3.2 beschrieben durchgeführt.

Die Schätzung des AFM₁-Gehaltes der Proben wurde durch den Vergleich der ermittelten relativen Extinktionen mit den Werten der gleichzeitig angesetzten Standards durchgeführt.

3.5.1.2 Ergebnisse

Die Berechnung der relativen Extinktion für die einzelnen Standards und Proben erfolgte wie unter 3.4.2. Für die semiquantitative Bestimmung des AFM₁-Gehaltes wurde ein Auswertungsschema erstellt. Ausgehend von den vier, für die Standards errechneten relativen Extinktionswerten (r.E.₀%, r.E.₁₀%, r.E.₂₀%, r.E.₅₀%) wurden acht Extinktionsintervalle festgelegt und jedem Intervall eine bestimmte AFM₁-Konzentration zugeordnet (Tab. 12).

Tab. 12: Auswertungsschema für die Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in Milch

Extinktions-Intervall		AFM ₁ -Konzentration
I r.E. ₀ % ± 3	=	0 pg AFM ₁ /ml
II r.E. ₀ % - 3,1 - r.E. ₁₀ % + 3,1	=	<10 pg AFM ₁ /ml
III r.E. ₁₀ % ± 3	=	10 pg AFM ₁ /ml
IV r.E. ₁₀ % - 3,1 - r.E. ₂₀ % + 3,1	=	>10 pg AFM ₁ /ml
		<20 pg AFM ₁ /ml
V r.E. ₂₀ % ± 3	=	20 pg AFM ₁ /ml
VI r.E. ₂₀ % - 3,1 - r.E. ₅₀ % + 3,1	=	>20 pg AFM ₁ /ml
		<50 pg AFM ₁ /ml
VII r.E. ₅₀ % ± 3	=	50 pg AFM ₁ /ml
VIII r.E. ₅₀ % - 3,1 -	=	>50 pg AFM ₁ /ml

Die relative Extinktion (r.E.%) der einzelnen Probenpaare wurde dem entsprechenden Intervall zugeordnet und der geschätzte AFM₁-Gehalt angegeben. Der Toxingehalt der Proben konnte in der überwiegenden Anzahl richtig geschätzt werden. In der Tab. 13 sind die Ergebnisse des semiquantitativen Nachweisverfahrens aufgeführt. Die in der Spalte "geschätzte AFM₁-Konzentration" in Klammern angegebenen Werte geben das gesuchte, richtige Ergebniss an.

Tab. 13: Auswertungsprotokoll des semiquantitativen Nachweisverfahrens

Anzahl der untersuchten Proben: 36

Datum:.....

- relative Extinktion (r.E.%) der Standards:

1. 0 pg AFM₁ /ml : 97,0%
2. 10 pg AFM₁ /ml : 75,4%
3. 20 pg AFM₁ /ml : 61,2%
4. 50 pg AFM₁ /ml : 39,7%

-Auswertungsschema:

Extinktions-Intervall		zugeordnete AFM ₁ -Konzentration
I 100,0% - 94,0%	=	0 pg AFM ₁ /ml
II 93,9% - 78,5%	=	<10 pg AFM ₁ /ml
III 78,4% - 72,4%	=	10 pg AFM ₁ /ml
IV 72,3% - 64,3%	=	>10 pg AFM ₁ /ml
		<20 pg AFM ₁ /ml
V 64,2% - 58,2%	=	20 pg AFM ₁ /ml
VI 58,1% - 42,8%	=	>20 pg AFM ₁ /ml
		<50 pg AFM ₁ /ml
VII 42,7% - 36,7%	=	50 pg AFM ₁ /ml
VIII >36,6%	=	>50 pg AFM ₁ /ml

- Auswertung des Probenmaterials:

Nummer der Probe	r.E.%	AFM ₁ pos./neg.		geschätzte AFM ₁ -Konzentration (pg AFM ₁ /ml)
		+	-	
1	16.9	+		>50
2	20.2	+		>50
3	28.3	+		>50
4	38.1	+		50
5	43.5	+		>20;<50
6	53.5	+		>20;<50
7	58.2	+		20 (Soll >20;<50)
8	62.5	+		20
9	70.1	+		>10;<20
10	74.3	+		10
11	91.9	+		<10
12	97.5	-		0
13	19.1	+		>50
14	21.3	+		>50
15	26.7	+		>50
16	37.0	+		50
17	42.7	+		50 (Soll >20;<50)
18	47.7	+		>20;<50
19	57.0	+		>20;<50
20	62.0	+		20
21	64.2	+		20 (Soll >10;<20)
22	76.5	+		10
23	94.1	-		0 (Soll <10)
24	101.2	-		0
25	12.3	+		>50
26	18.3	+		>50
27	26.2	+		>50
28	40.0	+		50
29	44.1	+		>20;<50
30	52.2	+		>20;<50
31	59.1	+		20 (Soll >20;<50)
32	59.4	+		20

Nummer der Probe	r.E.%	AFM ₁ pos./neg.		geschätzte AFM ₁ -Konzentration (pg AFM ₁ /ml)
		+	/ -	
33	69.6	+		>10;<20
34	73.1	+		10
35	90.2	+		<10
36	96.0	-		0

3.5.2 Nachweis von AFM₁ in natürlich kontaminierter Milch

3.5.2.1 Material und Methodik

In einem Versuch wurden einer Kuh 4,46 mg AFB₁ in ethanolisch-wässriger Lösung per os verabreicht. Die AFM₁-Ausscheidung in der Milch wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen kontrolliert.

Die Milchproben wurden vor der Untersuchung in einer Kühlzentrifuge (Variofuge RF, Haeraeus-Christ-GmbH) bei 4° C zehn Minuten mit 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der AFM₁-Gehalt der entrahmten Milchproben wurde anschließend semiquantitativ und quantitativ bestimmt. Zu Kontrollzwecken wurde ein Teil der entrahmten Milch tiefgefroren gelagert.

Die semiquantitative Bestimmung wurde wie unter 3.5.1.1 durchgeführt. Der quantitative AFM₁-Nachweis erfolgte nach der von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebenen Methode, wobei auf die Probenaufbereitung über Sep-pak C 18 Kartuschen verzichtet wurde. Die Standardkurve wurde in AFM₁-freier, entrahmter Rohmilch hergestellt. Während der ersten Untersuchungstage wurden die Milchproben mit AFM₁-freier, entrahmter Rohmilch verdünnt.

Der semiquantitative Nachweis wurde nach Abschluß des Versuches mit den tiefgefrorenen Milchproben wiederholt. Das Probenmaterial wurde bei den Kontrolluntersuchungen unverdünnt eingesetzt, um das Neutralisationsvermögen der anti-AFM₁-Antiserumverdünnung bei

hohen Toxinkonzentrationen zu prüfen. Die Extinktionswerte der mit der 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung inkubierten Standards und Milchproben wurde prozentual zu der Extinktion einer mit PBS inkubierten Nullprobe berechnet.

3.5.2.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in der Milch sind in der Tab. 14 zusammengefaßt. Der Verlauf der AFM₁-Ausscheidung ist in der Abb. 17 dargestellt.

Die höchste AFM₁-Konzentration wurde in dem ersten Gemelk, ca. zwölf Stunden nach der Toxinzufuhr, gemessen. Erhöhte Toxingehalte in der Milch konnten bis zum siebenten Tag festgestellt werden. Die geschätzten AFM₁-Gehalte der Milchproben stimmen mit den quantitativ ermittelten Werten überein.

Tab. 14: Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in natürlich kontaminierter Milch

Tag	semiquantitative AFM ₁ - Bestimmung (pg/ml) (morgens/abends)	quantitative AFM ₁ -Be- stimmung (pg/ml) (morgens/abends)
0	0	<5,0
1	>20; <50 / >20; <50	41,1 / 25,8
2	>20; <50 / 20	35,2 / 23,0
3	>20; <50 / 20	28,9 / 18,7
4	50 / >20; <50	51,6 / 30,6
5	>20; <50 / >20; <50	39,4 / 25,9
6	20 / 10	21,4 / 14,6
7	10 / <10	7,1 / <5,0

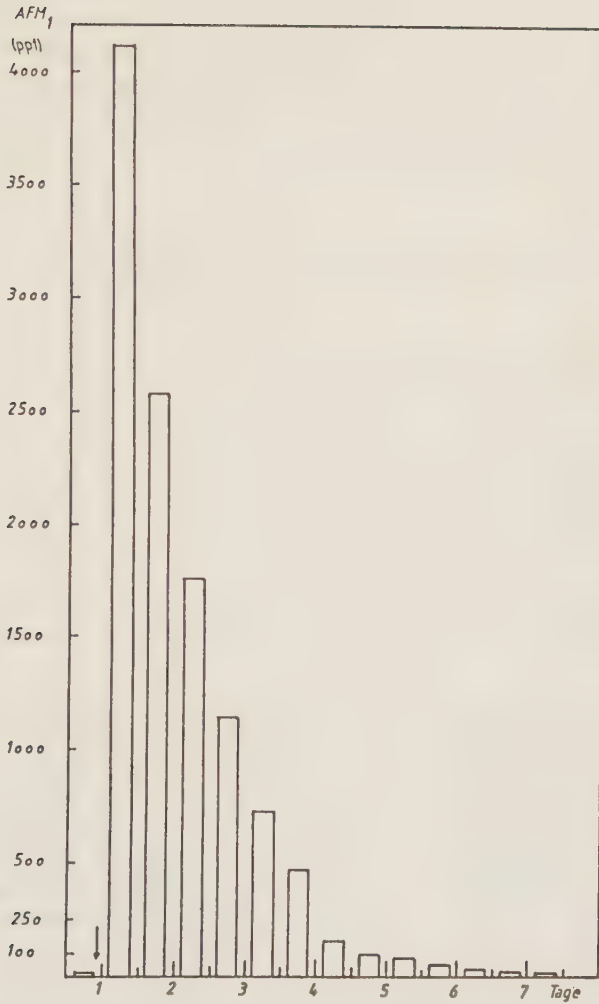


Abb. 17: AFB₁-Gehalte in der Milch einer Fleckviehkuh nach Applikation von 4,46 mg AFB₁ (↓), bestimmt mittels ELISA

Die Ergebnisse der semiquantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in den unverdünnten Milchproben und der Überprüfung des Neutralisationsvermögens der 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung sind in den Tab. 15 und 16 aufgeführt. In den ersten zwei Milchproben nach der Toxinapplikation konnten durch die Zugabe der spezifischen, gegen AFM₁-gerichteten Antikörper nicht alle AFM₁-Moleküle neutralisiert werden. Die Extinktionswerte der mit der anti-AFM₁-Antiserumverdünnung inkubierten Milchproben weichen deutlich von dem Extinktionswert der mit PBS inkubierten Nullprobe ab.

Tab. 15: Ergebnisse der semiquantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in unverdünnter, tiefgefrorener Milch

- Relative Extinktion der Standards:

1.	0 pg AFM ₁ /ml	:	102,5%
2.	10 pg AFM ₁ /ml	:	75,3%
3.	20 pg AFM ₁ /ml	:	58,0%
4.	50 pg AFM ₁ /ml	:	36,1%

- Auswertungsschema:

Extinktions-Intervall	zugeordnete AFM ₁ -Konzentration
I 105,5% - 99,5%	0 pg AFM ₁ /ml
II 99,4% - 78,4%	<10 pg AFM ₁ /ml
III 78,3% - 72,3%	10 pg AFM ₁ /ml
IV 72,2% - 61,1%	>10 pg AFM ₁ /ml; <20 pg AFM ₁ /ml
V 61,0% - 55,0%	20 pg AFM ₁ /ml
VI 54,9% - 39,2%	>20 pg AFM ₁ /ml; <50 pg AFM ₁ /ml
VII 39,1% - 33,1%	50 pg AFM ₁ /ml
VIII >33,0%	<50 pg AFM ₁ /ml

- Auswertung des Probenmaterials:

Tag	r.E.%	AFM ₁ pos./neg.		geschätzte AFM ₁ -Konzentration (pg AFM ₁ /ml)
		+	-	
0 (A)	97,9	-		0
1 (M)	26,4x	+		>50
1 (A)	23,0x	+		>50
2 (M)	16,5	+		>50
2 (A)	18,5	+		>50
3 (M)	19,2	+		>50
3 (A)	22,7	+		>50
4 (M)	24,0	+		>50
4 (A)	27,3	+		>50
5 (M)	30,1	+		>50
5 (A)	37,2	+		50
6 (M)	59,1	+		50
6 (A)	70,9	+		20
7 (M)	80,1	+		>10; <20
7 (A)	99,3	-		0

x = Die mit der 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung inkubierte Milchprobe konnte nicht vollständig dekontaminiert werden.
(vgl. Tab. 16)

Tab. 16: Ergebnisse zur Überprüfung des Neutralisationsvermögens der 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung

Tag	AFM ₁ -Gehalt der Milchproben (pg/ml)	relative Extinktion (in %) zu einer Nullprobe
0 (A)	<5,0	96,6
1 (M)	4112,3	52,8 ^x
1 (A)	2576,9	79,9 ^x
2 (M)	1758,3	93,8
2 (A)	1152,3	94,6
3 (M)	722,8	97,0
3 (A)	467,2	99,4

Tag	AFM ₁ -Gehalt der Milchproben (pg/ml)	relative Extinktion (in %) zu einer Nullprobe
4 (M)	154,9	99,4
4 (A)	91,9	98,7
5 (M)	78,8	96,0
5 (A)	51,9	97,9
6 (M)	21,4	101,3
6 (A)	14,6	97,8
7 (M)	7,1	98,2
7 (A)	<5,0	98,0

3.6 Untersuchungen zur Rationalisierung des semiquantitativen Nachweisverfahrens

Die Durchführung des semiquantitativen Nachweisverfahrens sollte durch die Modifikation verschiedener Materialien und Arbeitsschritte vereinfacht werden. Das Prinzip und die Auswertung des Verfahrens wurden nicht verändert.

3.6.1 Material und Methodik

Zur Neutralisation von AFM₁-Molekülen werden spezifische, gegen AFM₁-gerichtete Antikörper an eine Festkörperphase (Nunc-TSP-Platten, Nunc GmbH) adsorbiert. Dazu wird das anti-AFM₁-Antiserum mit dem Carbonat-Bicarbonatpuffer 1:1000 verdünnt und davon je 200 µl in festgelegte Kavitäten (●) einer Microelisaplatte (Nunc GmbH) pipettiert (Abb. 18).

Die Nunc-TSP-Platte wird jetzt auf die vorbereitete Microelisaplatte aufgesetzt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend dem Pipettierschema (Abb. 18) werden nur an jede zweite "Zapfenreihe" der Nunc-TSP-Platte spezifische, gegen AFM₁-gerichtete Antikörper adsorbiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
B	○	○	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
E	○	○	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 18: Pipettierschema für die Beschichtung der Nunc-TSP-Platte

Die Standardlösungen und Proben (200 µl/Kavität) werden nach einem festgelegten Schema jeweils auf zwei Kavitäten einer unbeschichteten Microelisaplatte aufgeteilt (Abb. 19, Ia + IIa). Anschließend wird die nach dem o.a. Schema teils mit der 1:1000 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung beschichtete teils unbeschichtete Nunc-TSP-Platte auf die mit den Standards und Proben bestückte Microelisaplatte aufgesetzt (Abb. 19, Ib + IIb) und in einer feuchten Kammer auf einem Taumelgerät (Heidolph) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Pipettierschemen für die 1:100 Beschichtung der Nunc-TSP-Platte und für die Bestückung der Microelisaplatte mit den Standards und Proben wurde so miteinander abgestimmt, daß jeweils nur in einer der beiden Kavitäten die AFM₁-Moleküle an die spezifischen, gegen AFM₁-gerichteten Antikörper gebunden und neutralisiert werden können (Abb. 19, Ic+d; IIc+d)

Im zweiten Teil des semiquantitativen Nachweisverfahrens wird die Extinktionsdifferenz (berechnet als relative Extinktion in %) ermittelt. Der ELISA wird unter Verwendung von Nunc-TSP-Platten als Immunosorbens durchgeführt. Zur Beschichtung der TSP-Platten wird das anti-AFM₁-Antiserum mit dem Carbonat-Bicarbonatpuffer 1:8000 verdünnt. Davon werden je 200µl in die Kavitäten einer Microelisaplatte pipettiert, die Nunc-TSP-Platte aufgesetzt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nunc-TSP-Platte wird anschließend mit toxinfreier, entrahmter

Milch abgesättigt (200 µl/Kavität). Nach ca. 30 Minuten wird sie dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Die zuvor mit der 1:1000 beschichteten Nunc-TSP-Platte über Nacht inkubierten Standardlösungen und Proben werden nun eine Stunde mit der 1:8000 beschichteten Nunc-TSP-Platte inkubiert (Abb. 19, Ie + IIe). Danach wird die Nunc-TSP-Platte dreimal gewaschen, ausgeschlagen und eine Stunde mit dem AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Verdünnung 1:40000; 200µl/Kavität) inkubiert (Abb. 19, IF + IIf). Anschließend wird das Enzymsubstrat (200µl/Kavität) auf eine Microelisa-platte pipettiert, die Nunc-TSP-Platte nochmals dreimal gewaschen und ausgeschlagen und dann bis zu einer deutlichen Farbreaktion mit dem Enzymsubstrat inkubiert (Abb. 19, Ig + IIg). Die enzymatische Reaktion wird mit 100 µl 1mol/l H₂SO₄ pro Kavität gestoppt (Abb. 19, Ih + IIh). Die Ermittlung des Substratumsatzes wird mittels des ELISA-Autoreaders (Dynatech) durchgeführt. Zur Berechnung der relativen Extinktion (in %) werden die Extinktionswerte der mit dem spezifischen Antiserum inkubierten Standards bzw. Proben mit 100% festgesetzt und der Extinktionswert des dazugehörigen Standard- bzw. Probenteiles prozentual dazu berechnet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt wie unter 3.5.1.2.

Das Neutralisationsvermögen der an die Festkörperphase adsorbierten spezifischen, gegen AFM₁-gerichteten Antikörper wurde analog zu 3.3 überprüft. Die sieben Toxinstandards, mit einem Toxingehalt von 1,37 pg AFM₁/ml bis 1000 pg AFM₁/ml, wurden über Nacht mit einer 1:100 beschichteten Nunc-TSP-Platte inkubiert. Danach wurden die Standards nach der oben beschriebenen Methode im enzymimmunologischen Verfahren eingesetzt. Die ermittelten Extinktionswerte wurden prozentual zu dem Extinktionswert einer Nullprobe berechnet.

Die Möglichkeit der semiquantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes wurde mit künstlich kontaminierter Milch kontrolliert. Der Toxingehalt der verschiedenen Proben (vgl. Tab. 11) wurde, analog zu 3.5.1, anhand von parallel angesetzten AFM₁-Toxinstandards geschätzt.

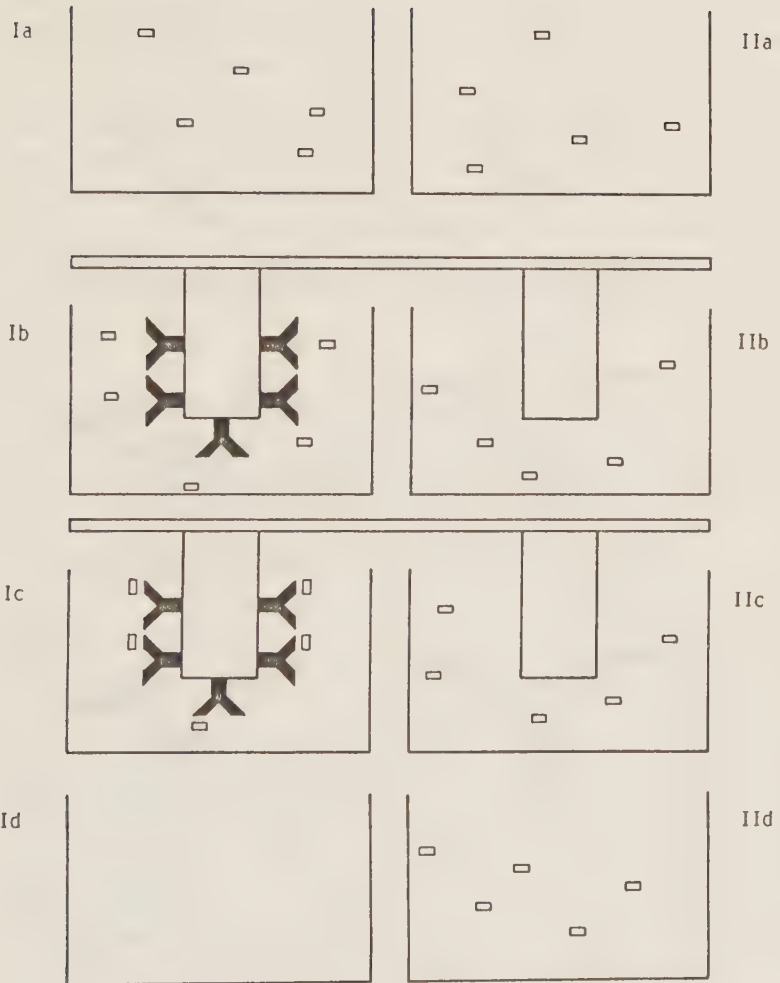


Abb. 19: Prinzip des semiquantitativen Nachweisverfahrens
(Durchführung mit Nunc-TSP-Platten)

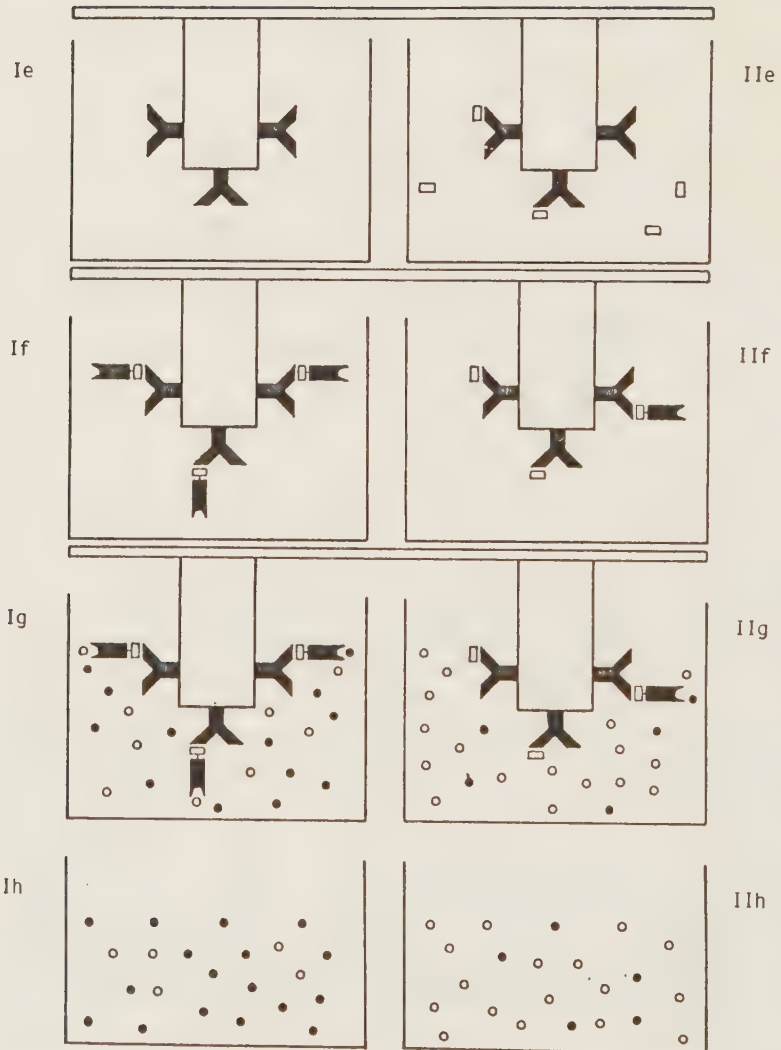


Abb. 19: Prinzip des semiquantitativen Nachweisverfahrens
(Durchführung mit Nunc-TSP-Platten), Teil 2

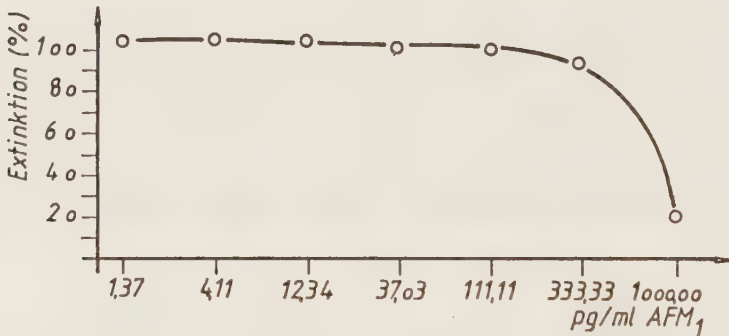
3.6.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Neutralisationsvermögens der an die Nunc-TSP-Platte adsorbierten spezifischen, gegen AFM₁-gerichteten Antikörper sind in der Tab. 17 zusammengefaßt. Die ermittelten Extinktionswerte der einzelnen Toxinstandards wurden prozentual zu dem Extinktionswert einer Nullprobe berechnet. Die Bindungskapazität der adsorbierten Antikörper ermöglicht die nahezu vollständige Neutralisation aller AFM₁-Moleküle bis zu einem Toxingehalt von ca. 333 pg AFM₁/ml. Bei 1000 pg AFM₁/ml zeigt sich eine deutliche Abweichung des ermittelten Wertes. Der Verlauf der AFM₁-Standardkurve nach Inkubation der Standards mit der 1:1000 beschichteten Nunc-TSP-Platte ist in der Abb. 20 dargestellt.

Tab. 17: Extinktionsmittelwerte (Ex) und Streuungsmaße (Standardabweichung s, Variationskoeffizient V%,) der AFM₁-Standards nach Inkubation mit einer 1:1000 beschichteten Nunc-TSP-Platte

AFM ₁ -Gehalt (pg/ml)	Ex (%)	s	V%	Ex _{min}	Ex _{max}	n
1,37	103,3	4,1	4,0	95,1	107,2	16
4,11	104,1	4,9	4,7	97,0	109,1	16
12,34	103,7	2,1	2,0	94,9	105,7	16
37,03	101,5	3,5	3,4	97,4	103,1	16
111,11	101,1	1,9	1,9	96,5	103,2	16
333,33	94,2	6,0	6,4	89,1	100,6	16
1000,00	21,1	5,2	24,6	16,2	24,3	16

Abb. 20: Verlauf der AFM₁-Standardkurve nach Inkubation der AFM₁-Standards mit einer 1:1000 beschichteten Nunc-TSP-Platte



Tab. 18: Auswertungsprotokoll für die semiquantitative Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in künstlich kontaminierter Milch

- Relative Extinktion der Standards:

1.	0 pg AFM ₁ /ml	:	95,4%
2.	10 pg AFM ₁ /ml	:	81,3%
3.	20 pg AFM ₁ /ml	:	65,9%
4.	50 pg AFM ₁ /ml	:	45,2%

- Auswertungsschema:

Extinktionsintervall	zugeordnete AFM ₁ -Konzentration
I 98,4% - 92,4%	0 pg AFM ₁ /ml
II 92,3% - 84,4%	<10 pg AFM ₁ /ml
III 84,3% - 79,3%	10 pg AFM ₁ /ml
IV 79,2% - 69,0%	>10 pg AFM ₁ /ml
	<20 pg AFM ₁ /ml
V 68,9% - 62,9%	20 pg AFM ₁ /ml
VI 62,8% - 48,3%	>20 pg AFM ₁ /ml
	>50 pg AFM ₁ /ml
VII 48,2% - 42,2%	50 pg AFM ₁ /ml
VIII >42,1%	>50 pg AFM ₁ /ml

- Auswertung des Probenmaterials:

Nummer der Probe	r.E.%	AFM ₁ pos./neg. + / -	geschätzte AFM ₁ -Konzentration (pg AFM ₁ /ml)
1	35.2	+	>50
2	26.7	+	>50
3	36.4	+	>50
4	44.3	+	50
5	49.1	+	>20;<50
6	55.6	+	>20;<50
7	59.5	+	>20;<50
8	63.2	+	20
9	71.2	+	>10;<20
10	79.5	+	10
11	87.3	+	10
12	96.0	-	0
13	31.3	+	>50
14	24.3	+	>50
15	33.9	+	>50
16	45.1	+	>50
17	47.3	+	50 (Soll >20; <50)
18	57.1	+	>20;<50
19	59.2	+	>20;<50
20	66.1	+	20
21	73.6	+	>10;<20
22	83.4	+	10
23	85.9	+	<10
24	90.1	+	<10 (Soll 0)
25	34.0	+	>50
26	28.0	+	>50
27	35.7	+	>50
28	44.6	+	50
29	49.1	+	>20;<50
30	55.1	+	>20;<50
31	57.4	+	>20;<50
32	62.4	+	>20;<50 (Soll 20)
33	71.3	+	>10;<20

Nummer der Probe	r.E.%	AFM ₁ pos./neg.		geschätzte AFM ₁ -Konzentration (pg AFM ₁ /ml)
		+	-	
34	84.5	+		<10 (Soll 10)
35	87.3	+		<10
36	99.3	-		0

Die in der Spalte "geschätzte AFM₁-Konzentration" in Klammern aufgeführten Werte entsprechen den gesuchten, richtigen Werten.

3.7 Untersuchungen zur Herstellung eines AFM₁-ELISA-Screening-Kits

Es sollte die Möglichkeit einer Lagerung antiserumbeschichteter Microelisaplaten, des AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugates und des Enzymsubstrates sowie des Substratpuffers untersucht werden.

3.7.1 Material und Methodik

Zehn Nunc-Immuno-Platten (Nunc-GmbH) wurden mit einer 1:6000 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung (100 µl/Kavität) beschichtet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten ausgeschlagen und mit AFM₁-freier, entrahmter Milch (200 µl/Kavität) abgesättigt. Neun der zehn Platten wurden nun direkt bei minus 80°C vier Stunden tiefgefroren und danach sofort gefriergetrocknet. Die lyophilisierten Platten wurden in einem Karton verpackt und bei Raumtemperatur gelagert. Mit der verbleibenden (10.) Platte wurde ein heterologer, kompetitiver ELISA, wie unter 3.2 beschrieben, durchgeführt. Die hierbei ermittelte AFM₁-Standardkurve diente als Kontrolle für die Standardkurven der gelagerten Platten.

Zur Durchführung des semiquantitativen und quantitativen Nachweisverfahrens mit Nunc-TSP-Platten (Nunc-GmbH) wurde das anti-AFM₁-Antiserum mit dem Carbonat-Bicarbonatpuffer 1:1000 bzw. 1:8000 verdünnt. Jeweils zehn der Nunc-TSP-Platten wurden mit den

hergestellten Serumverdünnungen beschichtet (200 µl/Kavität) und über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden anschließend mit AFM₁-freier, entrahmter Milch (200 µl/Kavität) ca. 30 Minuten abgesättigt. Jeweils neun der zehn Platten wurden dann ebenfalls bei minus 80°C tiefgefroren und danach sofort lyophilisiert. Auch diese Platten wurden in einem Karton verpackt und bei Raumtemperatur gelagert. Mit der verbleibenden (10.) 1:8000 beschichteten Nunc-TSP-Platte wurde ein heterologer, kompetitiver ELISA (vgl. 3.6.1) durchgeführt und die ermittelte Standardkurve zum Vergleich mit den Standardkurven der gelagerten Nunc-TSP-Platten herangezogen. Die verbleibende (10.) 1:1000 beschichtete Nunc-TSP-Platte wurde zur Überprüfung des Neutralisationsvermögens der an die Festkörperphase adsorbierten spezifischen, gegen AFM₁-gerichteten Antikörper verwendet. Entsprechend 3.6.1 wurden sieben AFM₁-Standards, mit einem Toxingehalt von 1,37 pg AFM₁/ml bis 1000 pg AFM₁/ml, über Nacht mit der Nunc-TSP-Platte inkubiert. Anschließend wurden die Standards im enzymimmunologischen Nachweisverfahren eingesetzt, die Extinktionswerte ermittelt und daraus eine Standardkurve erstellt. Sie diente als Kontrolle für das Neutralisationsvermögen der gelagerten, 1:1000 beschichteten Platten.

Jeweils eine Platte wurde nach Abschluß des Gefrier Trocknungsvorganges (Tag 1) untersucht. Die folgenden Untersuchungen wurden nach einer, zwei, vier, acht und zwölf Wochen durchgeführt. Vor der Verwendung der lyophilisierten, beschichteten Microelisaplaten wurde die gefriergetrocknete Milch mit reichlich Waschlösung aus den Kavitäten bzw. von den TSP-Zapfen gespült. Anschließend wurden die Platten ausgeschlagen und direkt mit den AFM₁-Standards bestückt.

Zur Überprüfung der Haltbarkeit des AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugates wurde das 1:100 mit 1% FCS/PBS (vgl. 3.2) vorverdünnte und lyophilisierte Konjugat mit 0,5 ml Aqua dest. gelöst und mit 10% FCS/PBS 1:40 weiterverdünnt (Zwischenverdünnung 1:4000 in 10% FCS/PBS). Jeweils ein Milliliter dieses zwischenverdünnten Konjugates wurde in Glasfläschchen pipettiert, bei minus 80°C tiefgefroren und lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Konjugat wurde bei minus 18°C aufgehoben, an den entsprechenden Untersuchungs-

tagen (vgl. oben) jeweils eine Portion mit 10 ml Aqua dest. gelöst (Endverdünnung 1:40000 in 1% FCS/PBS) und zur Erstellung einer AFM₁-Standardkurve verwendet. Ein Milliliter der Konjugatzwischenverdünnung (1:4000 in 10% FCS/PBS) wurde noch am Herstellungstag mit Aqua dest. 1:10 weiterverdünnt (Endverdünnung 1:40000 in 1% FCS/PBS) und im enzymimmunologischen Verfahren zur Erstellung einer Kontrollstandardkurve eingesetzt.

Das Enzymsubstrat und der H₂O₂-Puffer wurde entsprechend den Angaben unter 3.2 hergestellt. Jeweils 600 µl Enzymsubstrat bzw. 10 ml H₂O₂-Puffer wurden getrennt in Glasfläschchen lichtgeschützt bei 4°C gelagert. An den einzelnen Untersuchungstagen (vgl. oben) wurden 500 µl des gelagerten Enzymsubstrates zu 10 ml des gelagerten H₂O₂-Puffer pipettiert, auf einem Rüttler (Vortex) gut durchmischt und anschließend zur Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität eingesetzt. Die jeweils ermittelten Standardkurven wurden mit der am Herstellungstag erstellten AFM₁-Standardkurve verglichen.

3.7.2 Ergebnisse

Zur Beurteilung der Haltbarkeit der gelagerten Materialien wurden an den einzelnen Untersuchungstagen AFM₁-Standardkurven ermittelt und mit den am Herstellungstag erstellten AFM₁-Standardkurven verglichen. Aus den Extinktionswerten (n=4) für die verschiedenen AFM₁-Standardkonzentrationen wurden die Mittelwerte und Variationskoeffizienten berechnet. Zur vergleichenden Darstellung der Standardkurven wurden die Extinktions-Mittelwerte der Toxinstandards prozentual zu einer Nullprobe berechnet. Die Abweichungen der an den einzelnen Untersuchungstagen ermittelten Standardkurven wurden in den Graphiken als schraffiertes Feld dargestellt (Abb. 21 - 25). Dazu wurden jeweils der größte und kleinste ermittelte Extinktionswert für die entsprechende Toxinkonzentration in der Abbildung eingetragen und unter Verwendung eines biegsamen Lineals zu einer möglichst glatten Kurve verbunden. Die Vergleichsstandardkurve (Tag 0) ist gestrichelt dargestellt.

Die Aktivitätsschwankungen der antiserumbeschichteten Microelisa-platten (Nunc-Immuno-Platten 1:6000; Nunc-TSP-Platten 1:8000 sind in den Abb. 21 und 22 dargestellt. Die Bindungskapazität der Platten wird durch die Gefriertrocknung und zwölfwöchige Lagerung nicht wesentlich beeinflusst. Die gute Qualität der Antiserumbeschichtung wird durch die errechneten Variationskoeffizienten deutlich. Die Werte liegen in der Regel um fünf. Die Sensitivität des enzymimmunologischen Nachweisverfahrens für AFM_1 in Milch wird durch die Verwendung der gelagerten Microelisaplaten nicht verringert.

Das Neutralisationsvermögen der mit einer 1:1000 anti- AFM_1 -Antiserumverdünnung beschichteten Nunc-TSP-Platte ist in der Abb. 23 graphisch dargestellt. Mit zunehmender Lagerungsdauer nimmt das Neutralisationsvermögen des Immunosorbens ab. Nach acht bzw. zwölf Wochen weichen die ermittelten Extinktionswerte für die AFM_1 -Standards mit einem Toxingehalt von 333 pg AFM_1 /ml deutlich von den zuvor ermittelten Werten ab. Die über den Zeitraum von zwölf Wochen errechneten Variationskoeffizienten liegen deutlich unter zehn.

Die Ergebnisse zur Haltbarkeit der lyophilisierten Konjugat-Zwischenverdünnungen sind aus der Abb. 24 ersichtlich. Die Enzymaktivität wird durch die Gefriertrocknung und zwölfwöchige Lagerung nicht verändert.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse für das Enzymsubstrat und den H_2O_2 -Puffer (Tab. 19; Abb. 25) zeigt sich, daß nach acht bzw. zwölf Wochen die errechneten Variationskoeffizienten deutlich über zehn liegen. Durch die großen Schwankungen bei der Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität wird die Empfindlichkeit des enzymimmunologischen Nachweisverfahrens nachteilig beeinflusst.

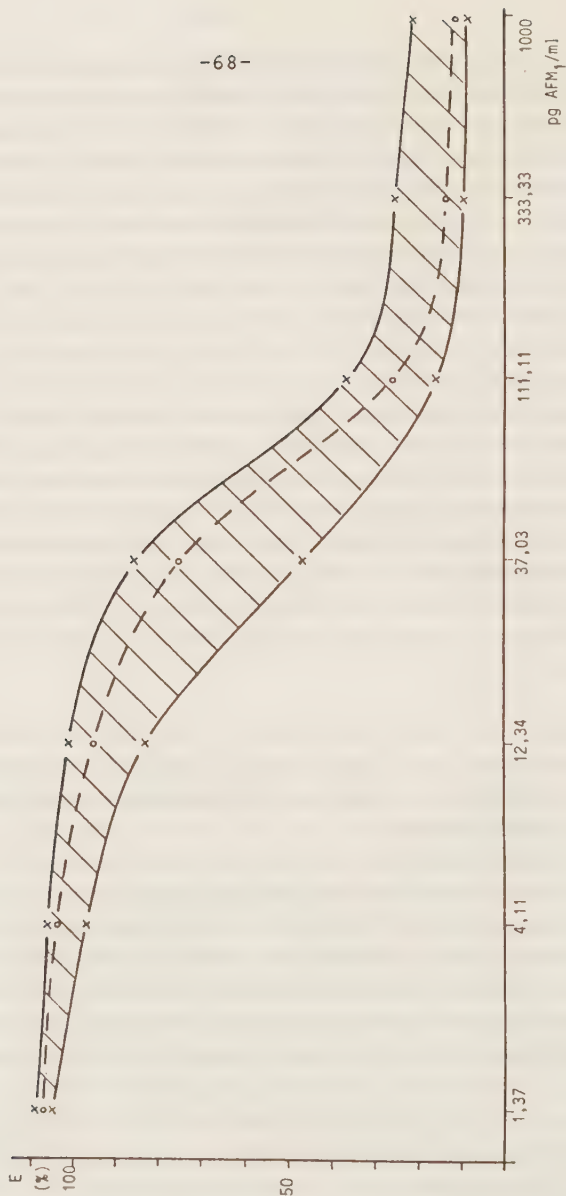


Abb. 21: Aktivitätsschwankungen von anti-AFM₁-beschichteten Nunc-Immuno-Platten (1:6000) während zwölfwöchiger Lagerung

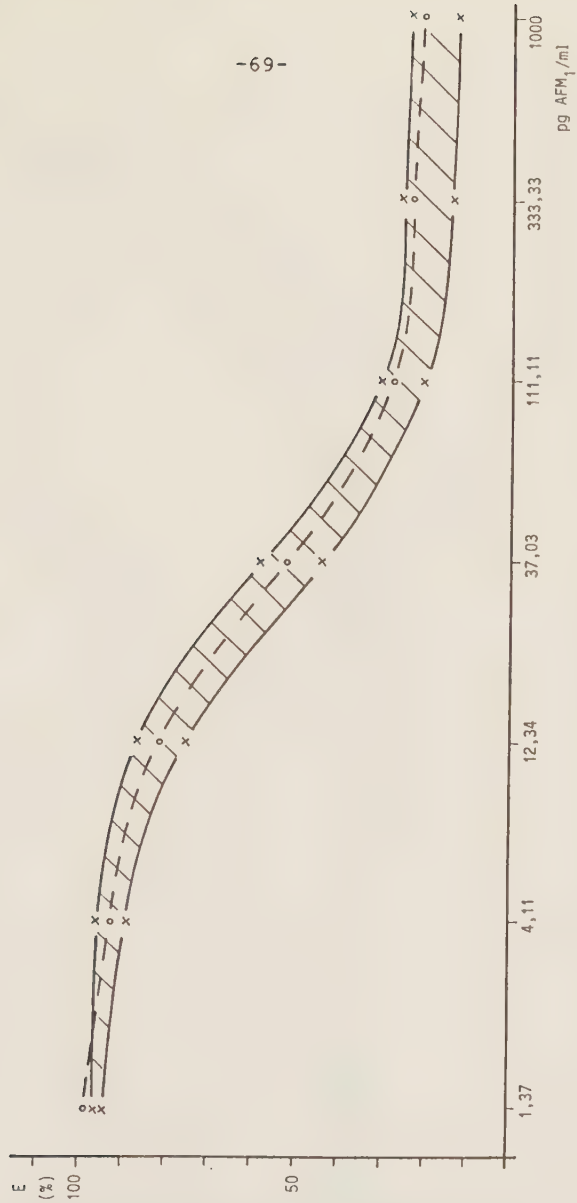


Abb. 22: Aktivitätsschwankungen von anti- AFM_1 -beschichteten Nunc-TSP-Platten (1:8000) während zwölfwöchiger Lagerung

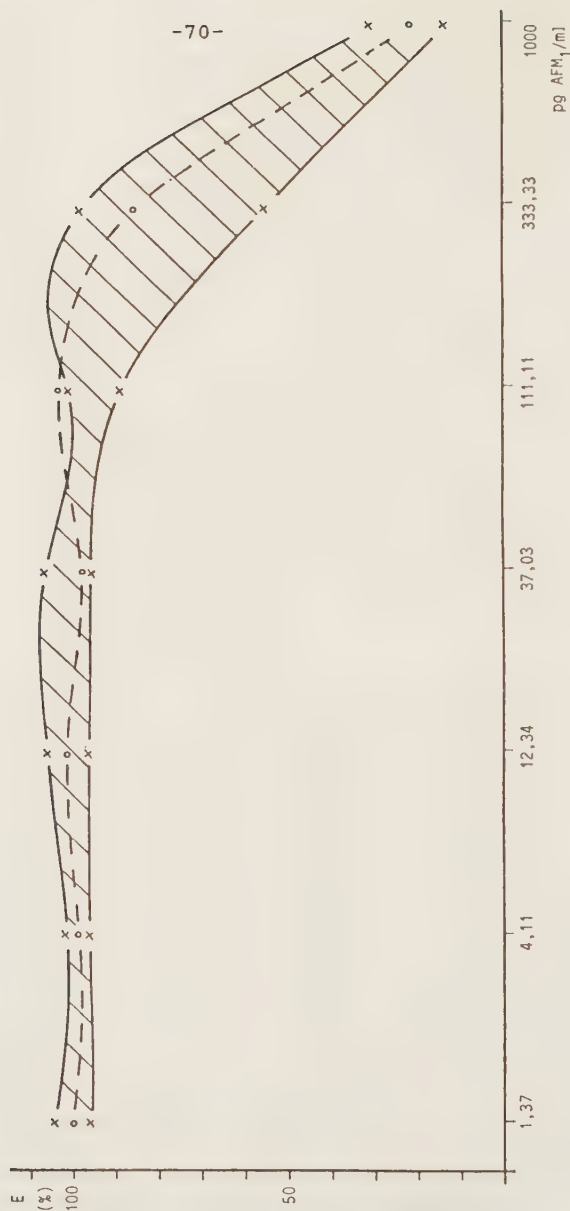


Abb. 23: AFM₁-Standardkurven nach Inkubation der AFM₁-Standards mit gelagerten, 1:1000 beschichteten Nunc-TSP-Platten

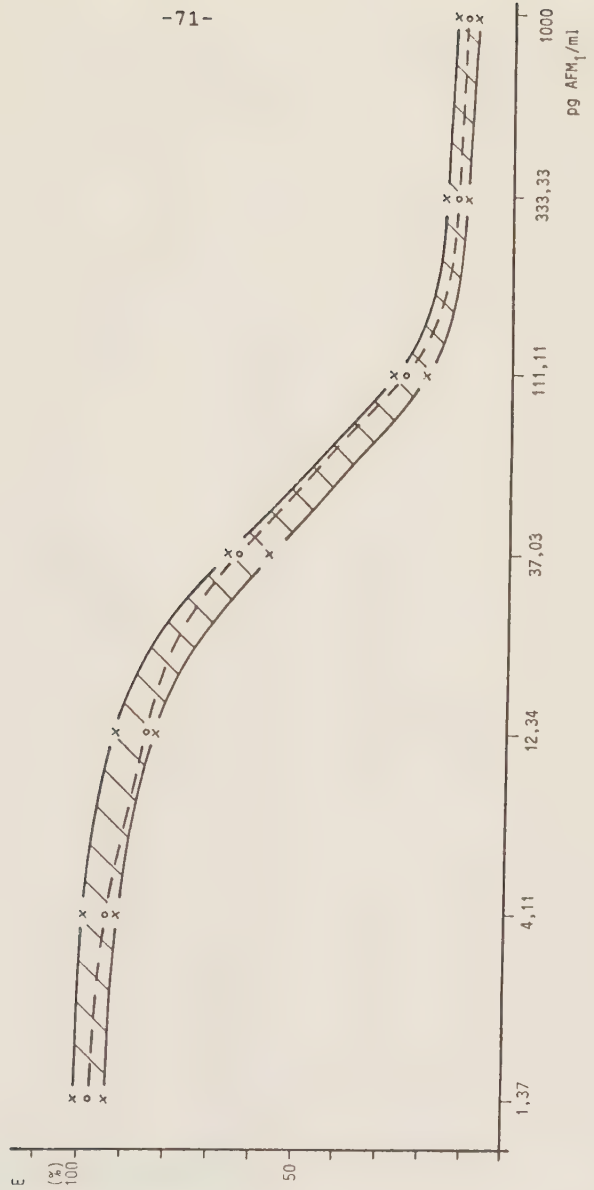


Abb. 24 : AFM₁-Standardkurven mit gelagertem AFB₁-Meerrettich-
peroxidase-Konjugat

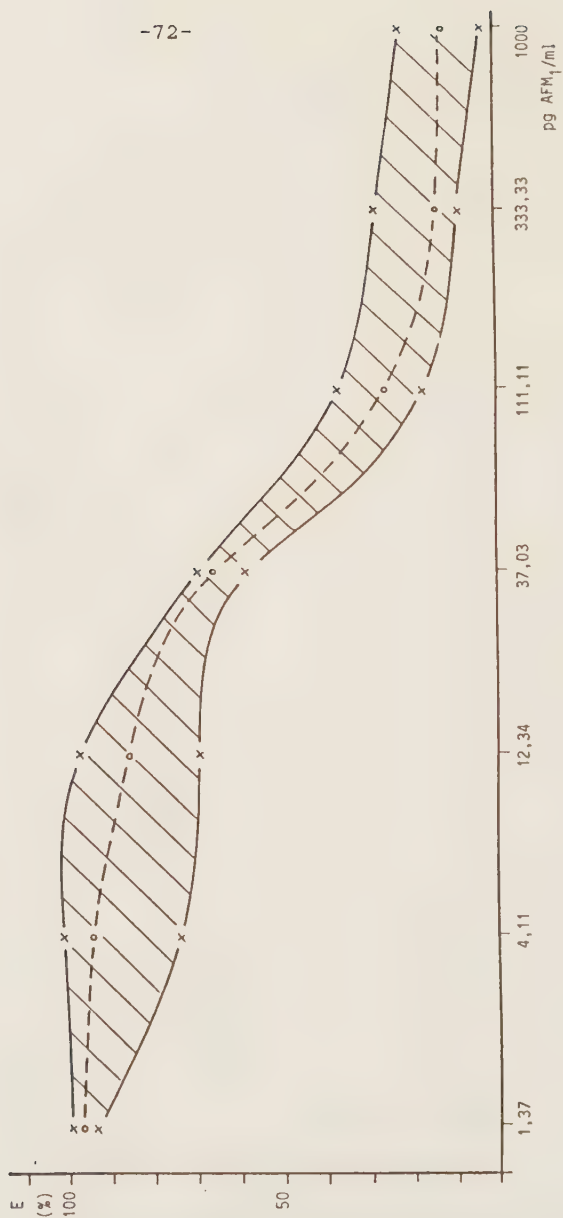


Abb. 25: AFM₁-Standardkurven mit gelagertem Enzymsubstrat und H₂O₂-Puffer

Tab. 19: Ermittelte Extinktionswerte (E), Variationskoeffizienten (V%) und relative Extinktionswerte in % (r.E.%) zur Erstellung einer AFM₁-Standardkurve bei der Verwendung von gelagertem Enzymsubstrat und H₂O₂-Puffer

Lagerungsdauer	AFM ₁ -Konzentration (pg/ml)	E	V%	r.E. (%)
Tag 0	0.00	0.956	2.2	100.0
	1.37	0.931	3.4	97.4
	4.11	0.901	1.4	94.2
	12.34	0.816	3.2	85.4
	37.03	0.622	4.1	65.1
	111.11	0.248	5.5	25.9
	333.33	0.131	1.4	13.7
	1000.00	0.114	2.3	11.9
Tag 1	0.00	1.135	1.7	100.0
	1.37	1.118	4.0	98.5
	4.11	1.097	1.9	96.7
	12.34	0.978	5.2	86.2
	37.03	0.711	5.4	62.6
	111.11	0.338	1.6	29.8
	333.33	0.174	0.9	15.3
	1000.00	0.164	3.9	14.4
Woche 1	0.00	1.078	4.3	100.0
	1.37	1.049	3.9	97.3
	4.11	1.008	3.3	93.5
	12.34	0.950	3.3	88.1
	37.03	0.660	1.4	61.2
	111.11	0.244	3.5	22.6
	333.33	0.127	3.5	11.8
	1000.00	0.121	4.1	11.2

Lagerungsdauer	AFM ₁ -Konzentration (pg/ml)	E	V%	r.E. (%)
Woche 2	0.00	1.027	6.7	100.0
	1.37	1.014	2.3	98.7
	4.11	.0981	4.3	95.5
	12.34	0.905	4.2	88.1
	37.03	0.703	8.7	68.5
	111.11	0.378	7.1	36.8
	333.33	0.287	8.1	27.9
	1000.00	0.225	7.5	21.9
Woche 4	0.00	1.151	2.4	100.0
	1.37	1.141	3.1	99.1
	4.11	1.089	3.0	94.6
	12.34	1.009	6.7	87.7
	37.03	0.769	11.1	66.8
	111.11	0.386	6.3	33.5
	333.33	0.228	1.6	19.8
	1000.00	0.213	5.7	18.5
Woche 8	0.00	1.002	13.4	100.0
	1.37	0.958	15.3	95.6
	4.11	1.005	14.1	100.3
	12.34	0.976	17.1	97.4
	37.03	0.652	8.4	65.1
	111.11	0.241	25.8	24.1
	333.33	0.170	6.5	17.0
	1000.00	0.125	5.7	12.5
Woche 12	0.00	0.885	19.7	100.0
	1.37	0.824	28.2	93.1
	4.11	0.654	15.5	73.9
	12.34	0.612	26.0	69.2
	37.03	0.520	12.3	58.8
	111.11	0.156	16.3	17.6
	333.33	0.070	3.5	7.9
	1000.00	0.027	2.9	3.1

4 Diskussion

Aflatoxine sind kanzerogene, mutagene und hochtoxische Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*. Die Kontamination der Lebens- und Futtermittel erfolgt mit Ausnahme der Milch durch den direkten Schimmelpilzbefall. Das mit der Milch ausgeschiedene AFM_1 entsteht als Metabolit des AFB_1 nach dem Verfüttern AFB_1 -haltiger Futtermittel an laktierende Rinder. Der Verzehr AFM_1 -haltiger Milch oder daraus hergestellter Milcherzeugnisse kann zu einer Gefährdung der menschlichen Gesundheit führen. Als besondere Risikogruppe sind dabei Säuglinge und Kleinkinder anzusehen, deren Ernährung zum überwiegenden Teil auf Milch und Milchprodukten beruht (MÜCKE und SCHULZE, 1981).

Höchstmengenregelungen für Aflatoxine, wie sie in der Aflatoxin-Verordnung (BGBL I S. 3313) und in der Futtermittelverordnung (BGBL I S. 170) getroffen sind, haben in den letzten Jahren zu einer Abnahme der Aflatoxin-Belastung in Lebens- und Futtermitteln geführt (KIERMEIER, 1985; HEESCHEN et. al., 1986). Mit der geplanten Einbeziehung von Grenzwerten für das AFM_1 in Milch und Milcherzeugnissen (unveröffentlichter Vorentwurf einer 1. Verordnung zur Änderung der Aflatoxin-Verordnung, Stand November 1985) wird nun auch der gesundheitsgefährdenden Bedeutung des AFM_1 Rechnung getragen.

Grundlegende Voraussetzung für den gezielten Schutz des Verbrauchers vor einer Gesundheitsgefährdung durch Aflatoxine sind geeignete Analyseverfahren zum Nachweis und der Bestimmung des AFM_1 -Gehaltes im ng/kg-Bereich und die konsequente Untersuchung der besonders gefährdeten Lebens- und Futtermittel.

Für die zuständigen Stellen ist der notwendige Umfang der Kontrollen von Lebens- und Futtermitteln auf Mykotoxine eine kaum zu bewältigende Aufgabe. Zur Durchführung sind deshalb Schnellmethoden für Probennahme, Aufarbeitung und Untersuchungsgang erforderlich (KIERMEIER, 1985).

In bezug auf die Aflatoxine und speziell für das AFM₁ ergeben sich durch die Entwicklung enzymimmunologischer Nachweisverfahren neue Perspektiven (PESTKA et. al., 1981; FREMY und CHU, 1984; MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985). Die Vorteile der Enzymimmunoassays zum Nachweis von AFM₁ in Milch und Milcherzeugnissen liegen vor allem in der Empfindlichkeit der Testsysteme, der Arbeits- und Zeitersparnis bei der Probenaufbereitung, dem geringeren Verbrauch an organischen Lösungsmitteln und der Möglichkeit zur Automatisierung des Tests (MÄRTLBAUER, 1985). Mit dem von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebenen enzymimmunologischen Nachweisverfahren für AFM₁ in Milch und Milchpulver können im Vergleich zu der amtlichen Methode (nach § 35 LMBG) an einem Tag von einer Arbeitskraft bis zu zehnmal mehr Proben untersucht werden. Der Test erreicht dabei eine Nachweisgrenze von ca. 2,5 ppt.

Der zeitintensivste Teil dieses Verfahrens ist die Vorbereitung der Proben. Durch diese Probenaufbereitung wird der täglich von einer Arbeitskraft zu bewältigende Probenumfang auf ca. 40 Proben begrenzt. Verzichtet man bei der quantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes auf die Probenaufbereitung, müssen die AFM₁-Standards in Milch angesetzt werden. Die Zusammensetzung der Milch, die zur Herstellung der Toxinstandards verwendet wird und die der zu untersuchenden Milchproben ist in der Regel nicht identisch. Störende Faktoren, wie unterschiedlicher Fettgehalt, pH-Wert oder der Zusatz von Konservierungsmitteln können dann zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen führen.

Bei den Untersuchungen zur Vereinfachung des enzymimmunologischen Nachweises von AFM₁ in Milch sollte deshalb versucht werden, eine Steigerung der Effektivität durch Verzicht auf die Probenaufbereitung bei gleichzeitiger Minimierung des störenden Einflusses der o. a. Faktoren zu erreichen. Bei der Durchführung des Verfahrens konnte auf das hochwertige Antiserum und auf das AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat zurückgegriffen werden. Beides stammt aus institutseigener Produktion und mußte für die Untersuchungen nicht eigens hergestellt werden. Bei der Antiserum-Beschichtung der Microelisaplaten sowie der Verdünnung des AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugates wurden die Erfahrungen des quantitativen ELISA berücksichtigt. Lediglich bei der Verwendung der

Nunc-TSP-Platten mußte die Abstimmung des ELISA modifiziert werden. Die Empfindlichkeit des Testsystems wurde dadurch nicht beeinträchtigt.

Grundlegende Voraussetzung für die hier beschriebene semiquantitative Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in Milch, ist die Neutralisation von AFM₁-Molekülen und die Ermittlung relativer Extinktionswerte. Es war deshalb erforderlich das Neutralisationsvermögen des spezifischen, gegen AFM₁-gerichteten Antiserums bzw. der daraus hergestellten Antiserumverdünnungen und die Signifikanz der relativen Extinktion in Abhängigkeit von der AFM₁-Konzentration zu überprüfen. Die Überprüfung des Neutralisationsvermögens wurde durch den Vergleich der Extinktionswerte der mit den verschiedenen anti-AFM₁-Antiserumverdünnungen inkubierten Toxinstandards (1,37 - 1000 pg AFM₁/ml) und der mit PBS inkubierten toxinfreien Nullprobe durchgeführt. Aufgrund des hohen Neutralisationsvermögens bei einstündiger Inkubationszeit wurden die weiteren Untersuchungen mit einer 1:1000 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung durchgeführt. Die Signifikanz der relativen Extinktion der mit PBS inkubierten Proben (bezogen auf den Extinktionswert des mit Antiserum inkubierten Probenanteiles) in Abhängigkeit von der Toxinkonzentration konnte statistisch abgesichert werden. Bei der Festsetzung der verwendeten Toxinkonzentrationen wurden die lebensrechtlich angestrebten Normen berücksichtigt. Anhand der ermittelten Ergebnisse konnte, nach Abstimmung und Standardisierung, ein enzymimmunologisches Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in Milch erarbeitet werden. Sowohl in künstlich als auch in natürlich kontaminierter Milch konnte damit zuverlässig die AFM₁-Konzentration geschätzt werden. Bei der Durchführung des semiquantitativen Verfahrens kann auf die Probenaufbereitung mittels Sep-pak C 18 Kartuschen verzichtet werden. Die AFM₁-Konzentration der zu untersuchenden Proben wird nicht wie bei der quantitativen Nachweismethode anhand einer optimierten, parallel zu den Proben angesetzten Standardkurve durch Interpolation ermittelt. Das Beurteilungskriterium für den Nachweis und die Bestimmung des AFM₁-Gehaltes ist allein die Extinktionsdifferenz (berechnet als relative Extinktion) innerhalb des Probenpaares, die auf den unterschiedlichen Toxingehalt der Probe nach Inkubation mit spezifischem anti-AFM₁-Antiserum bzw. mit PBS

zurückzuführen ist. Unterschiedliche Fettgehalte oder pH-Werte, die bei den quantitativen Nachweismethoden zu falsch positiven Ergebnissen führen können, spielen bei der semiquantitativen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes eine untergeordnete Rolle. Die in einer Milchprobe enthaltenen störenden Substanzen beeinflussen immer beide Probenanteile (Probe und anti-AFM₁-Antiserum bzw. Probe und PBS) und gleichen sich somit aus. Die qualitative Aussage "AFM₁-positiv" oder "AFM₁-negativ" wird nur durch die Ermittlung der relativen Extinktion getroffen. Die Quantifizierung des AFM₁-Gehaltes der Proben durch den Vergleich der errechneten, relativen Extinktionswerte mit denen der parallel angesetzten Toxinstandards kann durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Milch beeinflusst werden. Dementsprechend liefert der Vergleich nur Näherungswerte; die Aussage über den Toxingehalt der Proben ist semiquantitativ. Bei der Auswertung des untersuchten Probenmaterials wird deshalb den einzelnen Proben kein absoluter Wert sondern ein bestimmter "Toxin-Bereich" zugeordnet (Toxin-Intervalle zwischen "toxinfrei" und >50 pg AFM₁/ml). Als Beurteilungsmaßstab wurden die für Milch vorgesehenen Grenzwerte für AFM₁ (0, 10, 20 und 50 pg AFM₁/ml) herangezogen. Der Vergleich der für die Proben ermittelten relativen Extinktionswerte mit denen der parallel angesetzten Standards ermöglichte die Schätzung des AFM₁-Gehaltes bis zu 10 pg AFM₁/ml bzw. die Aussage "<10 pg AFM₁/ml" oder "toxinfrei". Das semiquantitative Verfahren entspricht damit in seiner Empfindlichkeit den lebensmittelrechtlich angestrebten Normen.

Da das Neutralisationsvermögen der eingesetzten anti-AFM₁-Antiserumverdünnung begrenzt ist, müssen zusätzlich zu der Berechnung der relativen Extinktionen die Extinktionswerte der mit dem Antiserum inkubierten Probenanteile mit den Extinktionswerten der Standards verglichen werden. Liegt der Wert für die neutralisierte Probe unter dem der Positivkontrolle, ist die entsprechende Probe auch dann als positiv zu werten, wenn zwischen beiden Probenanteilen keine Extinktionsdifferenz besteht, da möglicherweise ein Toxingehalt über 1000 ng AFM₁/l vorliegt. In der Regel liegen die AFM₁-Konzentrationen in der Milch in Deutschland unter 50 ng/l (HEESCHEN et. al., 1986), so daß die vollständige Neutralisation der AFM₁-Moleküle durch das spezifische anti-AFM₁-Anti-

serum in dem überwiegenden Anteil der Proben gewährleistet ist.

Ein Schwachpunkt des Verfahrens liegt zur Zeit noch in der Auswertung der Microelisaplaten. Die Ermittlung der Extinktionswerte erfolgt mittels eines ELISA-Autoreaders (Dynatech) in ca. 60 Sekunden, dabei werden die Werte auf einem Papierstreifen ausgedruckt. Die Berechnung der relativen Extinktion für die einzelnen Standards und Proben wurde mit Hilfe eines Taschenrechners und damit recht zeitaufwendig durchgeführt. Durch die Verwendung eines Computers, der mit dem ELISA-Autoreader verbunden ist und eines entsprechenden Auswertungsprogrammes, könnte die Auswertung, analog zum quantitativen Verfahren (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985), wesentlich vereinfacht werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Rationalisierung des semiquantitativen Nachweisverfahrens haben gezeigt, daß AFM_1 -Moleküle sowohl durch die Inkubation mit freiem anti- AFM_1 -Antiserum als auch durch die Inkubation mit den an eine Festkörperphase adsorbierten Antikörpern neutralisiert werden können. Beide Möglichkeiten eignen sich zur Anwendung im semiquantitativen Nachweisverfahren. Die Inkubation des Probenmaterials mit freien Antikörpern ermöglicht die Neutralisation größerer Mengen AFM_1 -Moleküle, erfordert aber mehr Pipettierschritte und größere Antiserum-mengen. Durch die Verwendung antiserumbeschichteter Nunc-TSP-Platten wird die Durchführung des Verfahrens vereinfacht. Das geringere Neutralisationsvermögen kann im Hinblick auf die durchschnittlich in der Milch vorhandenen AFM_1 -Konzentrationen in Kauf genommen werden.

Für die Herstellung eines " AFM_1 -ELISA-Screening-Kits" ist die ständige Verfügbarkeit aller für die Durchführung eines ELISA benötigten Reagenzien erforderlich. Dazu gehören Haltbarkeit des Immunosorbens, des AFB_1 -Meerrettichperoxidase-Konjugates und des Enzymsubstrates. Die Lagerung der antiserumbeschichteten und abgesättigten Microelisaplaten zeigte nach zwölfwöchiger Lagerung keine Beeinflussung der anti- AFM_1 -Antiserumaktivität. Das Neutralisationsvermögen der beschichteten Nunc-TSP-Platten verringerte sich nach achtwöchiger Lagerung. Die lyophilisierten Microelisaplaten müssen vor Gebrauch nur mit Waschlösung gespült werden

und können anschließend sofort mit dem Probenmaterial bzw. den Standards bestückt werden.

Das AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat wurde als konzentrierte Zwischenverdünnung lyophilisiert. Nach Zugabe von zehn Milliliter Aqua. dest. ist es ebenfalls sofort verwendbar. Während der zwölfwöchigen Lagerung konnte kein Aktivitätsverlust festgestellt werden.

Das Enzymsubstrat und der H₂O₂-Puffer wurden portioniert gelagert. Zur Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität muß das Enzymsubstrat lediglich zum H₂O₂-Puffer pipettiert werden. Nach achtwöchiger Lagerung wurde eine deutliche Erhöhung der Variationskoeffizienten festgestellt. Die Ergebnisse des ELISA können dadurch negativ beeinflusst werden. Die gebrauchsfertigen Enzymsubstratlösungen sollten, um die Sicherheit der Ergebnisse zu gewährleisten, nicht länger als vier Wochen verwendet werden. Die Herstellung des Substratpuffers (H₂O₂-Puffers) und des Enzymsubstrates aus den Ausgangssubstanzen dürfte jedoch in jedem Labor möglich sein.

Mit der Herstellung eines lagerfähigen, gebrauchsfertigen Immunosorbens und AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugates sind die Grundlagen für ein "AFM₁-ELISA-Test-Kit" geschaffen.

Limitierender Faktor für die Bereitstellung ausreichender Mengen an Reagenzien ist das spezifische, gegen AFM₁-gerichtete Antiserum, da für die Durchführung des semiquantitativen Nachweisverfahrens größere Mengen dieses anti-AFM₁-Antiserums erforderlich sind. Zur Gewinnung des hochwertigen Antiserums besteht zum einen die Möglichkeit der Immunisierung von Kaninchen mit AFM₁-HSA-Konjugat (Märtlbauer und TERPLAN, 1985) und zum anderen die Herstellung monoklonaler Antikörper (WOYCHIK et. al., 1985). Inwieweit die Verwendung monoklonaler Antikörper im enzymimmunologischen, semiquantitativen Nachweisverfahren möglich ist, müssen getrennte Untersuchungen zeigen. Zur Deckung des Bedarfs an spezifischen, gegen AFM₁-gerichteten Antikörpern könnte die Herstellung monoklonaler Antikörper bedeutend sein. Die Entwicklungen und Verbesserungen auf dem Gebiet der monoklonalen Antikörper gegen AFM₁ bleiben abzuwarten.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Möglichkeit zur Vereinfachung der enzymimmunologischen Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in Milch. Das Verfahren ist in seiner Durchführung einfach und weist eine hohe Empfindlichkeit auf. An einem Tag können von einer Arbeitskraft bis zu 200 Milchproben untersucht werden. Auf die quantitative Ermittlung der AFM₁-Konzentration mit einer physikalisch-chemischen Methode (nach § 15 LMBG) oder dem von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebenen Verfahren kann jedoch nicht verzichtet werden. Durch die Selektion AFM₁-haltiger Milchproben aus dem anfallenden Probenmaterial kann die Effektivität der Lebensmittelüberwachung und der betriebseigenen Kontrollen aber deutlich gesteigert und gleichzeitig der Arbeits- und Kostenaufwand reduziert werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein enzymimmunologisches Verfahren (ELISA), das ohne aufwendige Probenaufbereitung, eine semiquantitative Bestimmung des Aflatoxin M_1 (AFM_1)-Gehaltes in Milch ermöglicht. Das Prinzip des semiquantitativen Nachweisverfahrens ist die Bestimmung des Toxingehaltes einer Probe mit und ohne vorhergehende Neutralisation der Toxinmoleküle durch spezifisches Antiserum. Bei toxinhaltigen Proben differieren die ermittelten Extinktionswerte, während bei toxfreien Proben identische Werte erhalten werden.

Voraussetzung für dieses Verfahren ist ein ausreichendes Neutralisationsvermögen des spezifischen Antiserums. Versuche mit dem verfügbaren Antiserum zeigten, daß durch einstündige Inkubation mit einer 1:100 anti- AFM_1 -Antiserumverdünnung AFM_1 -Toxinstandards bis zu 1000 pg/ml neutralisiert werden können.

Für die Ermittlung der Extinktionsdifferenz (berechnet als relative Extinktion) zwischen AFM_1 -freien und AFM_1 -haltigen Probenanteilen wurde das Untersuchungsmaterial in zwei gleiche Mengen aufgeteilt. Ein Teil der Probe wurde eine Stunde mit einer 1:100 anti- AFM_1 -Antiserumverdünnung inkubiert; der andere Teil eine Stunde mit PBS. Anschließend wurden die Extinktionswerte der beiden Probenanteile mittels ELISA bestimmt. Zur Berechnung der relativen Extinktion wurde der Extinktionswert des nicht neutralisierten Probenanteiles in Prozent zu der Extinktion des neutralisierten Probenanteiles angegeben. Es zeigte sich, daß die errechneten relativen Extinktionen vom AFM_1 -Gehalt der Probe abhängig sind und zwischen den errechneten Werten verschiedener AFM_1 -Toxinstandards signifikante Unterschiede bestehen.

In Versuchen mit künstlich und natürlich kontaminierter Milch konnten mit der beschriebenen Methode zuverlässig AFM_1 -Gehalte in Milch festgestellt werden und durch den Vergleich der errechneten relativen Extinktionswerte mit denen parallel angesetzter Standards sicher abgeschätzt werden. Die untere Nachweisgrenze lag bei 10 pg AFM_1 /ml und entsprach der untersten lebensmittelrechtlich angestrebten Normen.

Zur Vereinfachung des Verfahrens wurde das Nunc-TSP-Platten-System angewandt. Die Nunc-TSP-Platten wurden nach einem festgelegten Schema mit einer 1:1000 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung beschichtet bzw. unbeschichtet gelassen und das Probenmaterial zur Toxinneutralisation mit diesen Platten inkubiert. Auch der anschließende ELISA wurde mit Nunc-TSP-Platten durchgeführt. Die Empfindlichkeit des Verfahrens wurde durch die Verwendung der Nunc-TSP-Platten als Immunosorbens nicht beeinträchtigt.

Im Hinblick auf die Herstellung eines "AFM₁-Test-Kits" wurden die Haltbarkeit antiserumbeschichteter Microelisaplaten, des AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugates und des Enzymsubstrates getestet. Die antiserumbeschichteten Microelisaplaten zeigten nach der Gefriertrocknung während zwölfwöchiger Lagerung keinen Aktivitätsverlust. Das Neutralisationsvermögen der 1:1000 beschichteten Nunc-TSP-Platten verringerte sich nach acht Wochen. Die lyophilisierten AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat-Zwischenverdünnungen konnten ohne Aktivitätsverlust zwölf Wochen verwendet werden. Das bei 4°C gelagerte Enzymsubstrat und der H₂O₂-Puffer konnten ohne Beeinträchtigung des ELISA-Testsystems nur vier Wochen verwendet werden.

Summary

Investigations to symplify the enzyme-immunoassay for aflatoxin M_1 in milk

The paper describes an enzyme-immunological technique (ELISA) that allows a semiquantitative assesment of the aflatoxin M_1 (AFM₁) contents in milk, omitting the extensive sample preparation.

The principle of this semiquantitative test is the assesment of the toxin contents in a sample with and without preliminary neutralisation of toxin molecules by a specific antiserum. Samples containing toxin show varying extinction values, as identified by the ELISA technique, while toxin free samples produce uniform results.

A precondition for this technique is a sufficient neutralizing capability of the specific antiserum. Tests with the available antiserum showed, that inkubation with a 1:100 anti-AFM₁-antiserumdilution for one hour, neutralized AFM₁-toxin standards of up to 1000 pg/ml.

In order to assess the extinction difference (computed as relative extinction) between AFM₁-containing and AFM₁-free samples the material was divided into two equal parts. One half of the sample was incubated for one hour with a 1:100 anti-AFM₁-antiserumdilution, the other half for one hour with phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, the extinction values of both groups were assessed with the ELISA-technique. The relative extinction value is computed as the percentage of the extinction value of the non-neutralizing sample to the neutralizing sample. It was shown, that the computed relative extinction values are related to the AFM₁-contents of the sample and that there are significant differences between the computed values of various AFM₁-toxinstandards.

Tests with artificially and naturally contaminated milk samples, using the described method, gave reliable results of the AFM₁-

contents and it was possible to give save estimates by comparing the computed relative extinction values with those of parallel assessed standards. The lower limit of detection was about 10 pg AFM₁/ml and conformed with the best standards intended by food legislation.

The Nunc-TSP-Plate-system was used to simplify the procedure. The plates were either covered with a layer of anti-AFM₁-antiserum dilution or left uncovered and then the samples were incubated for the neutralisation of toxin. The subsequent ELISA test was also carried out with Nunc-TSP-Plates. The sensitivity of the method was not affected by the use of the Nunc-TSP-plates as the immunosorbens.

In view of the possible production of a "AFM₁-test-kit" antiserum covered microelisaplates, the AFB₁-horseradish-peroxidase-conjugates and the enzymesubstrates were tested for durability. The microelisaplates showed no loss of actifity after being freeze-dried and stored for 12 weeks. The neutralizing capability of the Nunc-TSP-plates (with a 1:1000 dilution layer) dimininated after eight weeks. The various dilutions of the AFB₁-horseradish-peroxidase-conjugate could be used for 12 weeks without deterioration. The enzymesubstrate and H₂O₂-buffer (stored at 4°C) could only be used for four weeks without affecting the ELISA test-system.

6 Literatur:

ALLCROFT, R. und R.B.A. CARNAGHAN (1963):

Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal

Vet. Rec. 75, 259 - 263

ALLCROFT, R., H. ROGERS, G. LEWIS, J. NABNEY und P.E. BEST (1966):

Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk-toxin"

Nature 209, 154 - 155

APPLEBAUM, R.S., R.E. BRACKETT, D.W. WISEMAN und E.H. MARTH (1982):

Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products - a review

J. of Food Protection 45, 752 - 777

BIERMANN, A. (1980):

Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA

Diss. med. vet. München

BLÜTHGEN, A. (1980):

Mykotoxine in Milch (Kurzfassung)

in: Kolloquium "Entwicklung der Rückstandssituation"

am 4./5. Dez. in Bonn-Bad Godesberg

(unveröffentlicht)

Bundesgesundheitsamt (BGA) (1982):

Nachweis und Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchprodukten (Schuller-Methode)

Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG,

Bd. I/1, L 01.00-14

Beuth Verlag, Berlin - Köln

Bundesgesundheitsamt (BGA) (1987):

Nachweis und Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchprodukten

Amtl. Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 35 LMBG,
Bd. I/1, L 01.00-15

Beuth Verlag, Berlin - Köln

BUNDESMINISTER FÜR JUGEND, FAMILIE UND GESUNDHEIT (1985):

Entwurf: Erste Verordnung zur Änderung der Aflatoxin-Verordnung
(unveröffentlicht)

BUTLER, W.H. und J.I. CLIFFORD (1965):

Extraction of aflatoxin from rat liver

Nature 206, 1045 - 1046

CAMPBELL, T.C., J.P. CAEDO, J. BULATAO-JAYME, L. SALAMAT und
R.W. ENGEL (1970):

Aflatoxin M₁ in human urine

Nature 227, 403 - 404

CANTON, J.H., R. KROES, M.J. VAN LOGTEN, M. VAN SCHOTHORST,
J.F.C. STAVENUTTER und C.A.H. VERHÜLSDONK (1975):

The carcinogenicity of aflatoxin M₁ in rainbow trout

Food Cosmet. Toxicol. 13, 441 - 443

CHANG, H.L. und J.W. DE VRIES (1983):

Rapid high pressure liquid chromatographic determination of
aflatoxin M₁ in milk and nonfat dry milk

J. AOAC 66, 913 - 917

COHEN, H., M. LAPOINTE und J.M. FREMY (1984):

Determination of aflatoxin M₁ in milk by liquid chromatography
with fluorescence detection

J. AOAC 67, 49 - 51

COOPER, T.G. (1981):

Biochemische Arbeitsmethoden

Walter de Gruyter, Berlin - New York

DALEZIOS, J.I., D.P.H. HSIEH und G.N. WOGAN (1973):
Excretion and metabolism of orally administered B₁ by
rhesus monkeys
Food Cosmet. Toxicol. 11, 605 - 616

DE IONGH, H., R.O. VLES und J.G. VAN PELT (1964):
Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet
Nature 202, 466 - 467

DIJK, H.J., G.D. O'DELL und A.B. BODINE (1984):
Effects of aflatoxin M₁ intake at physiologic levels on
newborn dairy calves
Am. J. Vet. Res. 45, 1994 - 1997

FERGUSON-FOOS, J. und J.D. WARREN (1984):
Improved clean-up for liquid chromatographic analysis and
fluorescence detection of aflatoxins M₁ and M₂ in fluid
milk products
J. AOAC 67, 1111 - 1114

FRANK, K.H. (1976):
Überlegungen zur Höchstmengenbegrenzung von Mykotoxinen, be-
sonders von Aflatoxinen
Dtsch. Gesundheitswesen 31, 961 - 964
zit. n. MÜCKE, W. und H. Schulze (1981):
Höchstmengenregelungen für Mykotoxine
in: REISS, J. (1981):
Mykotoxine in Lebensmitteln
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

FREMY, J.M. und F.S. CHU (1984):
Direct enzyme-linked immunosorbent assay for determining
aflatoxin M₁ at picogram levels in dairy products
J. AOAC 67, 1098 - 1101

FRITZ, W. (1983):
Untersuchungen zum Vorkommen ausgewählter Mykotoxine in
Lebensmitteln
Z. ges. Hyg. 29, 650 - 654

FROBISH, R.A., B.D. BRADLEY, D.D. WAGNER, P.E. LONG-BRADLEY
und H. HAIRSTON (1986):

Aflatoxin residues in milk of dairy cows after investigation
of naturally contaminated grain

J. of Food Protection 49, 781 - 785

FUKAYAMA, M., W. WINTERLIN und D.P.H. HSIEH (1980):

Rapid method for analysis of aflatoxin M₁ in dairy products

J. AOAC 63, 927 - 930

FUTTERMITTELGESETZ (1975):

BGBL I S. 1745

FUTTERMITTELVERORDNUNG (1985):

BGBL I S. 170

HEESCHEN, W., A. BLÜTHGEN und H. NIJHUIS (1986):

Entwicklungstendenzen in der rückstandshygienischen Situation
der Milch

Kieler milchwirtschaftliche Forschungsberichte 38, 131 - 145

HSIEH, D.P.H. und B.H. RUEBNER (1984):

An assesment of cancer risk from aflatoxins B₁ and M₁

in : KURATA, H. und Y. UENO (1984):

Toxigenic fungi - their toxins and health hazard, p. 332 - 338

Elsevier Verlag, Amsterdam - Oxford - New York - Tokio

HOLZAPFEL, C.W. und P.S. STEYN (1966):

Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂

Tetrahedron Letters 25, 2799 - 2803

HU, W.J., N. WOYCHIK und F.S. CHU (1984):

ELISA of picogramm quanties of aflatoxin M₁ in urine and milk

J. of Food Protection 47, 126 - 127

INTERNATIONALER MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1983):

Milch und Milchprodukte - Bestimmung von Aflatoxin M₁,

Vorläufiger internationaler IMV-Standard III, 1982

Milchwissenschaft 38, 160 - 163

KIERMEIER, F. (1973):

Mykotoxine in Milch und Milchprodukten

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 151, 237 - 240

DERSELBE (1985):

Das Mykotoxin-Problem: Ergebnisse der Lebensmittelüberwachung

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 180, 389 - 393

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1985):

Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver

Archiv für Lebensmittelhygiene 36, 53 - 55

MÄRTLBAUER, E. (1985):

Zur Systematik und praktischen Anwendung enzymimmunologischer Nachweise von Mykotoxinen

in: Mykotoxin Workshop "Berichterstatttung und interner Erfahrungsaustausch über Trichothecene und andere toxische Metabolite von Pilzen" am 19./20. März in München

(unveröffentlicht)

DERSELBE (1987):

Persönliche Mitteilung

MAJERUS, P. und R. WOLLER (1985):

Aflatoxin M₁ in Milch und Milcherzeugnissen. Methodik und Bestandsaufnahme

Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 39, 29 - 46

MASRI, M.S., R.E. LUNDIN, J.R. PAGE und V.L. GARCIA (1967):

Crystalline aflatoxin M₁ from urine and milk

Nature 215, 753 - 755

MILLER, M., F. KIERMEIER, G. WEISS und H. KLOSTERMEYER (1980):

Aflatoxin M₁ in Milch und Milchprodukten

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 171, 20 - 23

MOREAU, C. (1979):

Moulds, toxins and food

Ed. John Wiley, Chichester ¹ New York - Brisbane - Toronto

MÜCKE, W. und H. SCHULZE (1981):

Höchstmengenregelungen für Mykotoxine

in: REISS, J. (1981):

Mykotoxine in Lebensmitteln, p. 489 - 509

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

MÜLLER, U. (1984):

Kantonales Laboratorium Bern. Jahresbericht 1983

zit. n. KIERMEIER, F. (1985):

Das Mykotoxin-Problem: Ergebnisse der Lebensmittelüberwachung

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 180, 389 - 393

PATTERSON, D.P.S., E.M. GLANCY und B.A. ROBERTS (1980):

The "carry over" of aflatoxin M₁ into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁

Food. Cosmet. Toxicol. 18, 35 - 37

PATTERSON, D.P.S., B.J. SHREEVE und B.A. ROBERTS (1980):

Mycotoxin residues in body fluids and tissues of food-producing animals

in PREUSSER (1980):

Medical Mycology, Zbl. Bakt. Suppl. 8, p. 321 - 328

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

PESTKA, J.J., Y. LI, W.O. HARDER und F.S. CHU (1981):

Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ in milk

J. AOAC 64, 294 - 301

PRICE, R.L., J.H. PAULSON, O.G. LOUGH, C. GINGG und

A.G. KURTZ (1985):

Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed

J. of Food Protection 48, 11 - 15

POLZKOFER, K. (1977):

Aflatoxinbestimmung in Milch und Milchprodukten

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 163, 175 - 177

PURCHASE, I.F.H. (1967):

Acute toxicity of aflatoxins M_1 and M_2 in one-day-old ducklings

Food Cosmet. Toxicol. 5, 339 - 342

PURCHASE, I.F.H. und M. STEYN (1968):

The production of aflatoxin M_1 on various substrates

Mycopath. Mycol. Appl. 35, 239 - 244

QIAN, G.-S., P. YASEI und G.C. YANG (1984):

Rapid extraction and detection of aflatoxin M_1 in cow's milk by high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay

Anal. Chem. 56, 2079 - 2080

REISS, J. (1981):

Mykotoxine in Lebensmitteln

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

DERSELBE (1981):

Studies on the formation of aflatoxin M_1 in bakery products

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 172, 26 - 29

SCHABORT, J.C. und M. STEYN (1969):

Substrat and phenobarbitolinducible aflatoxin-4-hydroxylation and aflatoxin metabolism by rat liver microsomes

Biochem. Pharmacol. 18, 2241 - 2252

SERRALHEIRO, M.L. und M.L. QUINTA (1985):

Rapid thin layer chromatographic confirmation of aflatoxin M_1 in powdered milk

J. AOAC 68, 952 - 954

DIESELBEN (1986):

Thin layer chromatographic confirmation of aflatoxin M_1 extracted from milk

J. AOAC 69, 886 - 888

SIEBER, R. und B. BLANC (1978):

Zur Ausscheidung von Aflatoxin M₁ in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten - Eine Literaturübersicht
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 69, 477 - 491

SINNHUBER, R.O., D.J. LEE, J.H. WALES, M.K. LANDERS und A.C. KEYL (1970):

Aflatoxin M₁: a potent liver carcinogen for rainbow trout
Fed. Proc. 29, 568

STEINER, W. und R. BATTAGLIA (1983):

Eine rationelle Methode zur Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver im unteren ppt-Bereich
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 74, 140 - 146

STOLOFF, L. (1980):

Aflatoxin M₁ in perspective
J. of Food Protection 43, 226 - 230

STUBBLEFIELD, R.D. und G.H. SHANNON (1974):

Aflatoxin M₁: Analysis in dairy products and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk
J. AOAC 57, 847 - 851

STUBBLEFIELD, R.D. (1979):

The rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products
J. Amer. Oil Chem. Soc. 56, 800 - 802

STUBBLEFIELD, R.D. und W.F. KWOLEK (1986):

Rapid liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ and M₂ in artificially contaminated fluid milks: collaborative study
J. AOAC 69, 880 - 885

TUINSTRA, L.G.M. TH und J.M. BRONGSGEEST (1975):

Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion level
J. of Chromatography 111, 448 - 451

TUINSTRAL, L.G.M.TH und W. HAASNOOT (1982):

Rapid HPLC-method for the detection of aflatoxin M₁ in milk
at the ng/kg level

Fresenius Z. Anal. Chem. 312, 622 - 623

VERORDNUNG ÜBER HÖCHSTMENGEN AN AFLATOXINEN IN LEBENSMITTELN
(AFLATOXIN-VERORDNUNG) (1976):

BGBL I S. 3313

WINTERLIN, W., G. HALL und D.P.H. HSIEH (1979):

On-column chromatographic extraction of aflatoxin M₁ from milk
and determination by reversed phase high performance liquid
chromatography

Analytical Chemistry 51, 1873 - 1874

WOGAN, G.N. und S. PAGLIALUNGA (1974):

Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats

Food Cosmet. Toxicol. 12, 381 - 384

WOGAN, G.N. (1975):

Mykotoxins

Am. Rev. Pharmacol. 15, 437 - 451

WONG, J.J. und D.P.H. HSIEH (1967):

Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and
carcinogenic potential

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2241 - 2244

zit. n. REISS, J. (1981):

Mykotoxine in Lebensmitteln, p. 223 - 242

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

WONG, J.J., R. SINGH und D.P.H. HSIEH(1977):

Mutagenicity of fungal metabolites related to aflatoxin
biosynthesis

Mutation Res. 44, 447 - 450

WOLLER, R. (1981):

Häufigkeit des Vorkommens von Mykotoxinen in der Bundesrepublik Deutschland

in REISS, J. (1981):

Mykotoxine in Lebensmitteln, p. 143 - 170

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

WOYCHIK, N.A., R.D. HINS DILL und F.S. CHU (1984):

Production and characterization of monoklonal antibodies against aflatoxin M₁

Appl. Environ. Microbiol. 48, 1096 - 1099

YOUSEF, A.E. und E.H. MARTH (1985):

Rapid reverse phase liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk

J. AOAC 68, 462 - 465

ZIMMERLI, B. (1977):

Beitrag zur Bestimmung von Aflatoxinen mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 68, 36 - 45

ZIMMERLI, B. und O. BLASER (1979):

Vorkommen von Aflatoxin M₁ in Milch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 70, 287 - 293

Lebenslauf

Am 4. Januar 1959 wurde ich, Andreas Siegfried Heusel, als viertes Kind des Pfarrers Siegfried Heusel und seiner Frau Eva, geb. Nemeth, in Ingelheim am Rhein geboren.

Nach Besuch der Pestalozzi Schule in Ingelheim von 1965 bis 1969 trat ich in das Sebastian-Münster-Gymnasium in Ingelheim ein, an dem ich im Juli 1978 die Reifeprüfung bestand.

Den Wehrdienst leistete ich von Januar 1979 bis März 1980 ab.

Im Sommersemester 1980 begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Veterinärmedizin. Nach Abschluß des fünften Fachsemesters im Sommer 1982 setzte ich das Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und bestand dort im August 1985 das Tierärztliche Staatsexamen. Im September 1985 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

In den Wintermonaten 1985 und 1986 arbeitete ich als freier Mitarbeiter in der Tierarztpraxis Dr. R. Hoffmann, Großköllnbach. Seit Juni 1987 arbeite ich als praktischer Tierarzt in Geisenhausen.

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine Anleitung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn E. Märtlbauer für die wertvollen Anregungen, seine stets freundliche Hilfe und sein Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Den Mitarbeitern des Instituts danke ich für die gewährten Hilfen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

